

# THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES  
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

**Georges GIRAUD**

---

**1<sup>re</sup> THÈSE** — LA STRUCTURE, LES PIGMENTS ET LES CARACTÉRISTIQUES  
FONCTIONNELLES DE L'APPAREIL PHOTOSYNTHÉTIQUE DE  
DIVERSES ALGUES

**2<sup>e</sup> THÈSE** — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 21 novembre 1963, devant la Commission d'examen

|                    |                     |
|--------------------|---------------------|
| MM. PLANTEFOL..... | <i>Président</i>    |
| MOYSE.....         | } <i>Examineurs</i> |
| BUVAT.....         |                     |

---

PARIS

GAUTHIER-VILLARS ÉDITEUR

55, quai des Grands-Augustins

---

1963



# THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES  
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

**Georges GIRAUD**

---

**1<sup>re</sup> THÈSE** — LA STRUCTURE, LES PIGMENTS ET LES CARACTÉRISTIQUES  
FONCTIONNELLES DE L'APPAREIL PHOTOSYNTHÉTIQUE DE  
DIVERSES ALGUES

**2<sup>e</sup> THÈSE** — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 21 novembre 1963, devant la Commission d'examen

|                    |                     |
|--------------------|---------------------|
| MM. PLANTEFOL..... | <i>Président</i>    |
| MOYSE.....         | { <i>Examineurs</i> |
| BUVAT.....         |                     |

---

PARIS  
GAUTHIER-VILLARS ÉDITEUR  
55, quai des Grands-Augustins

---

1963

# FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

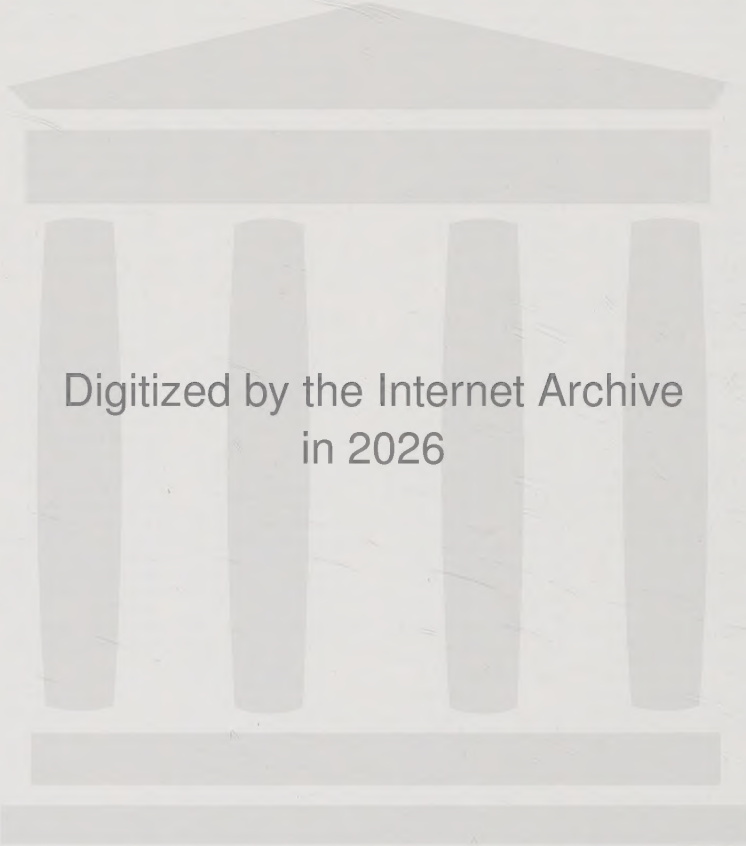
Doyen ..... M. ZAMANSKY

## PROFESSEURS :

|                       |                                                   |                        |                                                 |
|-----------------------|---------------------------------------------------|------------------------|-------------------------------------------------|
| JULIA G. .... T       | Analyse supérieure et Algèbre supérieure.         | SCHWARTZ ..... T       | Calcul différentiel et intégral.                |
| DE BROGLIE .... T     | Théories physiques.                               | CHOUARD ..... T        | Physiologie végétale.                           |
| PRENANT ..... T       | Anatomie et Histologie comparées.                 | MALAVARD ..... T       | Aviation. Technique aéronautique.               |
| GRASSÉ ..... T        | Evolution des êtres organisés.                    | BRELOT ..... T         | Calcul différentiel et intégral.                |
| PRÉVOST ..... T       | Chimie organique.                                 | NORMANT ..... T        | Synthèse organique générale.                    |
| CHAUDRON ..... T      | Chimie appliquée.                                 | BENARD ..... T         | Chimie minérale.                                |
| WYART ..... T         | Minéralogie et Cristallographie.                  | BUVAT ..... T          | Botanique (E.N.S.).                             |
| TEISSIER ..... T      | Zoologie.                                         | DUGUE ..... T          | Statistiques mathématiques                      |
| MANGENOT ..... T      | Biologie végétale (Orsay).                        | SOULAIRAC ..... T      | Psychophysiologie.                              |
| AUGER ..... T         | Physique quantique et Relativité.                 | ULRICH ..... T         | Physiologie végétale.                           |
| MONNIER ..... T       | Physiologie générale.                             | MARÉCHAL ..... T       | Optique théorique et appliquée.                 |
| PIVETEAU ..... T      | Paléontologie.                                    | KIRRMANN ..... T       | Théories chimiques.                             |
| ROCARD ..... T        | Physique (E.N.S.).                                | CHADEFAUD ..... T      | Botanique.                                      |
| CARTAN ..... T        | Mathématiques (E.N.S.).                           | Mlle LE BRETON ..... T | Physiologie de la nutrition.                    |
| LAFFITTE ..... T      | Chimie générale.                                  | SALEM ..... T          | Mathématiques générales.                        |
| FAVARD ..... T        | Géométrie supérieure.                             | LELONG ..... T         | Application de l'analyse à la géométrie.        |
| COULOMB ..... T       | Physique du globe.                                | DEVILLERS ..... T      | Anatomie et Histologie comparées.               |
| Mlle COUSIN ..... T   | Biologie animale S.P.C.N.                         | EHRSMANN ..... T       | Topologie algébrique.                           |
| CHRÉTIEN ..... T      | Chimie minérale.                                  | FRANCON ..... T        | Physique S.P.C.N.                               |
| DRACH ..... T         | Zoologie.                                         | GLANGEAUD ..... T      | Géographie physique et Géologie dynamique.      |
| KASTLER ..... T       | Physique (E.N.S.).                                | GODEMENT ..... T       | Mathématiques M.P.C.                            |
| EPHRUSSI ..... T      | Génétique.                                        | PISOT ..... T          | Techniques mathématiques de la physique.        |
| RIVIÈRE ..... T       | Géologie S.P.C.N. et Sédimentologie.              | ROCH ..... T           | Géologie.                                       |
| GAUTHERET ..... T     | Biologie végétale P.C.B.                          | SCHATZMAN ..... T      | Astrophysique.                                  |
| LUCAS R. .... T       | Recherches physiques.                             | TERMIER ..... T        | Paléontologie stratigraphique.                  |
| THOMAS ..... T        | Biologie cellulaire.                              | ZAMANSKY ..... T       | Mathématiques générales.                        |
| ARNULF ..... T        | Optique appliquée.                                | LENNUIER ..... T       | Physique M.G.P.                                 |
| MORAND ..... T        | Physique enseignement.                            | RIZET ..... T          | Génétique (Orsay).                              |
| SOEILLET ..... T      | Physique P.C.B.                                   | ROUTHIER ..... T       | Géologie appliquée.                             |
| FORTIER ..... T       | Mécanique expérimentale des fluides.              | Mme TONNELAT ..... T   | Physique théorique.                             |
| DANJON ..... T        | Astronomie.                                       | DIXMIER ..... T        | Mathématiques M.P.C.                            |
| PETIT ..... T         | Biologie maritime.                                | SOUCHAY ..... T        | Chimie générale.                                |
| QUENEY ..... T        | Météorologie et Dynamique atmosphérique.          | AIGRAIN ..... T        | Electrotechnique générale.                      |
| GALLIEN ..... T       | Embryologie.                                      | BRUSSET ..... T        | Chimie systématique.                            |
| EICHORN ..... T       | Botanique.                                        | LÉVY M. .... T         | Physique théorique des hautes énergies (Orsay). |
| DE CUGNAC ..... T     | Biologie végétale S.P.C.N.                        | Mme CHAIX ..... T      | Chimie biologique.                              |
| Mlle CAUCHOIS ..... T | Chimie physique.                                  | Mme HUREL-PY ..... T   | Biologie végétale P.C.B.                        |
| THELLIER ..... T      | Physique du globe.                                | PIAUX ..... T          | Chimie M.P.C.                                   |
| L'HÉRITIER ..... T    | Biologie générale (Orsay).                        | BRUN ..... T           | Mécanique théorique des fluides.                |
| GRIVET ..... T        | Radioélectricité (Orsay).                         | LEDERER ..... T        | Chimie biologique                               |
| PONCIN ..... T        | Mécanique générale.                               | Mme DUBREIL ..... T    | Mathématiques Agrégation                        |
| DUBREIL ..... T       | Arithmétique et Théorie des nombres.              | Mme LELONG ..... T     | Mathématiques (E.N.S.)                          |
| QUELET ..... T        | Chimie organique.                                 | BELLAIR ..... T        | Géologie S.P.C.N.                               |
| CAGNIARD ..... T      | Géophysique appliquée.                            | COTTE ..... T          | Physique Electricité.                           |
| CHAMPETIER ..... T    | Chimie macromoléculaire.                          | DUBOIS ..... T         | Chimie organique.                               |
| CUVILLIER ..... T     | Micropaléontologie.                               | LAMOTTE ..... T        | Zoologie E.N.S.                                 |
| JUNG ..... T          | Pétrographie.                                     | MICHEL A. .... T       | Chimie minérale (Orsay).                        |
| TRILLAT ..... T       | Microscopie et Diffraction électronique.          | OLMER ..... T          | Energetique générale.                           |
| WIEMANN ..... T       | Chimie organique et structurale.                  | ROUALT ..... T         | Electricité (Orsay).                            |
| JACQUINOT ..... T     | Spectroscopie et physique céleste (Orsay).        | GAUTHIER ..... T       | Mécanique appliquée.                            |
| VASSY ..... T         | Physique de l'atmosphère.                         | BARCHWITZ ..... T      | Chimie physique.                                |
| DESTOUCHES ..... T    | Théories physiques.                               | BROSSEL ..... T        | Physique atomique.                              |
| AMIEL ..... T         | Chimie générale.                                  | BUSER ..... T          | Physiologie comparée.                           |
| HOCART ..... T        | Minéralogie et Cristallographie.                  | CAMUS ..... T          | Physiologie végétale B.M.P.V.                   |
| MATHIEU ..... T       | Physique Optique.                                 | CASTAING ..... T       | Physique (Orsay).                               |
| COUTEAUX ..... T      | Biologie animale P.C.B.                           | CURIEN ..... T         | Minéralogie et Cristallographie.                |
| MAY ..... T           | Zoologie (Orsay).                                 | MOYSE ..... T          | Physiologie végétale (Orsay).                   |
| CHOQUET ..... T       | Théorie des fonctions et Topologie.               | NOIROT ..... T         | Evolution des êtres organisés.                  |
| FELDMANN ..... T      | Biologie végétale marine.                         | PANNETIER ..... T      | Chimie générale (Orsay)                         |
| GUINIER ..... T       | Physique du solide (Orsay).                       | POSSOMPES ..... T      | Zoologie.                                       |
| JOST ..... T          | Physiologie comparée.                             |                        |                                                 |
| FORTET ..... T        | Calcul des probabilités et Physique mathématique. |                        |                                                 |

|                        |   |                                                    |                          |                                                                                   |
|------------------------|---|----------------------------------------------------|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| PULLMANN .....         | T | Chimie théorique.                                  | ELLENBERGER .....        | Géologie appliquée sur le terrain.                                                |
| TEILLAC .....          | T | Physique nucléaire et Radioactivité.               | FRANC .....              | Biologie animale P.C.B.                                                           |
| TONNELAT .....         | T | Biologie physico-chimique.                         | SCHNELL .....            | Botanique tropicale (Orsay).                                                      |
| VILLE .....            | T | Econométrie.                                       | STOLKOWSKI .....         | Physiologie générale.                                                             |
| WILLEMART .....        | T | Chimie P.C.B.                                      | ACHER .....              | Chimie biologique (Orsay).                                                        |
| DODE .....             | T | Chimie (Orsay).                                    | BAUDOIN .....            | Biologie animale P.C.B.                                                           |
| FREYMAN .....          | T | Recherches physiques.                              | BEAUMONT .....           | Biologie animale S.P.C.N.                                                         |
| GUINOCHE .....         | T | Biologie végétale S.P.C.N. (Orsay).                | BLAMONT .....            | Géophysique ionosphère.                                                           |
| ROLLET .....           | T | Chimie P.C.B.                                      | BOURREAU .....           | Botanique.                                                                        |
| Mlle JOSIEN .....      | T | Chimie S.P.C.N.                                    | CURIE .....              | Physique M.G.P.                                                                   |
| CHEVALLEY .....        | T | Géométrie algébrique et Théorie des groupes.       | DURAND-DELGA .....       | Géologie.                                                                         |
| ARNOULT .....          | T | Electronique (Orsay).                              | HELLER .....             | T Chimie organique (Orsay).                                                       |
| CHAPELLE .....         | T | Physique (Orsay).                                  | TORTRAT .....            | Physiologie végétale.                                                             |
| DELANGE .....          | T | Mathématiques (Orsay).                             | CAILLEUX .....           | Calcul des probabilités.                                                          |
| DENY .....             | T | Mathématiques générales (Orsay).                   | MAGNAN .....             | T Géologie S.P.C.N.                                                               |
| GERMAIN .....          | T | Mécanique théorique des fluides.                   | DAUDEL .....             | T Physique S.P.C.N.                                                               |
| LUCAS G. ....          | T | Géologie.                                          |                          | Mécanique ondulatoire appliquée à la Chimie théorique et à la Physique nucléaire. |
| ALLARD .....           | T | Chimie physique.                                   | Mlle FOURCROY .....      | Biologie végétale S.P.C.N.                                                        |
| BERTHELOT .....        | T | Physique fondamentale des hautes énergies (Orsay). | Mme CHOQUET-BRUHAT ..... | T Mécanique analytique et Mécanique céleste.                                      |
| BRICART .....          | T | Météorologie et Physique de l'atmosphère.          | Mlle WEIL .....          | Physiologie générale.                                                             |
| Mme ALBE-FESSARD ..... |   | Phychophysiologie.                                 | LWOFF .....              | T Microbiologie.                                                                  |
| FRIEDEL .....          |   | Physique du solide (Orsay).                        | SIESTRUNCK .....         | T Mécanique physique et expérimentale.                                            |
| JULIA M. ....          |   | Etudes des moléculaires naturelles complexes.      | LACOMBE .....            | T Métallurgie des métaux nucléaires.                                              |
| LENDER .....           | T | Biologie animale S.P.C.N. (Orsay).                 | BROCHARD .....           | T Physique M.P.C. (Orsay).                                                        |
| MAGAT .....            |   | Physico-chimie des radioéléments.                  | CABANNES .....           | T Mécanique générale.                                                             |
| Mlle QUINTIN .....     | T | Electrochimie.                                     | LESIEUR .....            | T Mathématiques M.P.Ct (Orsay).                                                   |
| MONOD .....            | T | Chimie du métabolisme.                             | MAZET .....              | T Mécanique générale (Orsay).                                                     |
| BENOIT .....           | T | Physiologie animale (Orsay).                       | CAIRE .....              | Géographie physique et Géologie dynamique.                                        |
| DE POSSEL .....        | T | Analyse numérique.                                 | COMOLET .....            | Mécanique des fluides.                                                            |
| CHARLOT .....          | T | Chimie analytique.                                 | CORABOEUF .....          | Physiologie animale.                                                              |
| HAISSINSKY .....       | T | Radiochimie.                                       | DELLOUE .....            | Physique de l'exosphère.                                                          |
| LEMEE .....            | T | Physiologie végétale B.M.-P.V. (Orsay).            | GORENFLOT .....          | Biologie végétale.                                                                |
| GUERIN .....           | T | Chimie M.P.C. (Orsay).                             | HOUILLON .....           | Biologie animale P.C.B.                                                           |
| CHATELET .....         |   | Chimie P.C.B.                                      | JULLIEN .....            | Chimie M.P.C. (Orsay).                                                            |
| JEAN .....             | T | Physique nucléaire (Orsay).                        | MALGRANGE .....          | T.M.P. (Orsay).                                                                   |
| MATTLER .....          | T | Physique S.P.C.N.                                  | OLIVIER .....            | Anthropologie.                                                                    |
| MICHEL L. ....         |   | Physique théorique des hautes énergies (Orsay).    | NOZERAN .....            | T Botanique II (Orsay).                                                           |
| BERGERARD .....        |   | Zoologie (Orsay).                                  | BLANC-LAPIERRE .....     | Physique (E.N.S. Orsay).                                                          |
| BERTEIN .....          |   | Electronique (Orsay).                              | CHEVAUGEON .....         | T Botanique (Orsay).                                                              |
| BOUSSIÈRES .....       |   | Chimie des radioéléments (Orsay).                  | KAHANE .....             | T Mathématiques (Orsay).                                                          |
| Mme COUTURE .....      |   | Thermodynamique et Mécanique physique.             | SAMUEL .....             | T Mathématiques (E.N.S. féminine).                                                |
|                        |   |                                                    | KOURGANOFF .....         | T Astronomie (Orsay).                                                             |
|                        |   |                                                    | THIRY .....              | T Mécanique céleste.                                                              |

Secrétaire général ..... R. POULLAIN



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

## La structure, les pigments et les caractéristiques fonctionnelles de l'appareil photosynthétique de diverses algues

Georges GIRAUD

Laboratoire de Photosynthèse du C.N.R.S., Gif-sur-Yvette (S.-&-O),  
Laboratoire de Botanique, Ecole Normale Supérieure, Paris, France.

(Manuscrit reçu le 7 juillet 1963)

### RÉSUMÉ

La culture et l'analyse pigmentaire de *Rhodorus marinus* GEITLER, (Rhodophycée Porphyridiale) et de *Stichochrysis* sp. (Chrysophycée) ont été réalisées. Les pigments de *Rhodorus* sont identiques à ceux de *Porphyridium cruentum*. *Stichochrysis* contient de la chlorophylle *c* en faible quantité. Ses spectres d'absorption *in vivo* font apparaître vers 700 m $\mu$  un complexe pigmentaire lié à la chlorophylle *a* et dont l'importance varie avec le mode de culture. Il existe aussi chez *Stichochrysis* un pic de fluorescence à 717 m $\mu$ . Les mêmes conditions régissent l'apparition et la disparition du complexe à 700 m $\mu$  et de la fluorescence à 717 m $\mu$ .

La fluorescence de la chlorophylle *a* de *Rhodorus marinus* subit des variations en fonction des conditions de culture ou de la pression osmotique du milieu. Ces variations peuvent être interprétées comme des modifications des transferts d'énergie entre les phycobilines et la chlorophylle.

Parallèlement, une étude infrastructurale de l'appareil photosynthétique a été faite. Elle montre que les principaux groupes d'algues peuvent être distingués par la disposition des saccules. *Stichochrysis* possède des lamelles très fines et très serrées. Sauf pour cette espèce, l'épaisseur des saccules est constante pour les autres algues étudiées.

La méthode de la coloration négative apporte des précisions nouvelles sur la structure granulaire des lamelles.

Une estimation de la surface lamellaire a permis de vérifier que la chlorophylle devait former une monocouche à la surface externe des lamelles des Rhodophycées et des Chrysophycées.

Le stroma des plastes de *Rhodorus* gonfle en milieu hypotonique et se contracte en milieu hypertonique ; ces observations, reliées aux modifications des transferts d'énergie, permettent de considérer que les biliprotéines sont localisées dans le stroma. Le volume présumé de celles-ci confirme ce point de vue.

La réduction du nitrate d'argent obtenue par la réaction de MOLISCH dans les plastes des Rhodophycées est localisée sur les lamelles, ce qui confirmerait l'hypothèse selon laquelle la chlorophylle serait liée au mécanisme de cette réaction.

### SUMMARY

The culture and the pigment analysis of *Rhodorus marinus* GEITLER (Rhodophyceae Porphyridiale) and of *Stichochrysis* sp. (Chrysophyceae) have been carried out. The pigments of *Rhodorus* are identical to those of *Porphyridium cruentum*. *Stichochrysis* contains chlorophyll *c* in small amounts. Its absorption spectra *in vivo* show a pigment complex, bound to chlorophyll *a*, the relative amount of which varies with growth conditions.

There is also in the case of *Stichochrysis* a fluorescence peak at 717 m $\mu$ . The same conditions control the appearance and the disappearance of the complex at 700 m $\mu$  and the fluorescence at 717 m $\mu$ .

The chlorophyll a fluorescence in *Rhodospirillum rubrum* undergoes variations with the growth conditions and the osmotic pressure of the medium. These variations can be interpreted as modifications of the energy transfer between phycobilins and chlorophyll.

Concurrently, a study of the fine structure of the photosynthetic apparatus was carried out. It shows that the main groups of algae can be distinguished by the arrangement of the discs. *Stichochrysis* shows very fine and compact lamellae. Except for the latter case, the thickness of the lamellae is constant for all the algal species studied.

The negative staining technique brings out new precisions on the granular structure of the lamellae.

An estimate of the lamellar area brings evidence for the hypothesis that chlorophyll forms a monolayer at the external surface of the lamellae of *Rhodophyceae* and *Chrysophyceae*. The stroma of the plastids of *Rhodospirillum rubrum* swells in hypotonic and contracts in hypertonic media. These observations added to the modifications of the energy transfer plead in favor of the localization of the biliproteins in the stroma. The total calculated volume of these biliproteins in situ confirms that point of view.

The silver reduction given by the MOLISCH reaction in *Rhodophyceae* plastids is localized on the lamellae. This seems to confirm the hypothesis of a possible role played by chlorophyll in that reaction.

## INTRODUCTION

Les chloroplastes des Végétaux supérieurs et les plastes diversement colorés des algues sont le siège de la photosynthèse. Cette fonction commune laisse supposer des rapports étroits de structure, de composition chimique et des analogies physiologiques. Pourtant l'aspect morphologique, les dimensions de ces plastes et la nature des pigments qu'ils renferment, présentent une grande diversité. S'opposant à cette diversité, il existe un caractère commun d'ordre physiologique reliant étroitement tous les plastes, c'est l'unité photosynthétique, définie par EMERSON et ARNOLD (1932) qui contient deux à trois cents molécules de chlorophylle et un centre enzymatique.

En l'absence d'organe nettement différencié du cytoplasme, la photosynthèse se produit encore chez les Cyanophycées où le plaste périphérique « diffus » n'est pas limité par une membrane, mais où il fonctionne comme chez les autres végétaux ; il en est de même chez les bactéries photosynthétiques. D'après les observations au microscope électronique, il semble que la présence de lamelles soit le seul caractère cytologique commun à tous les plastes et qui soit lié à la fonction chlorophyllienne.

### Définitions

Biliprotéines (terminologie de O'h ECHA, 1962) = bilichromoprotéines.

Cellules *au repos* = Resting cells

Lamelle simple ou lamelle élémentaire = couche formée par une unité membranaire.

Plaste = sera le seul terme employé pour définir les organites à pigments assimilateurs des algues à la place de chloroplastes, chromoplastes, phéoplastes, rhodoplastes.

Sacculés = disques (GIBBS, 1960) = thylakoïdes (MENKE, 1962) = lamelles doubles.

Tris maléate = tris hydroxyméthyl amino méthane + maléate.

Unité membranaire = Unit-membrane (ROBERTSON, 1959).

Ces lamelles forment des saccules, appelés encore disques (GIBBS, 1960) ou thylakoïdes (MENKE, 1962) et sont caractéristiques de l'appareil pigmentaire ; elles s'associent de manière particulière entre elles et avec des *disques granaires* et différencient des *granums* chez les Végétaux supérieurs et chez quelques Conjugatophycées (DRAWERT et MIX, 1961). Cette structure n'existe pas dans les autres groupes d'Algues.

C'est donc au niveau de la structure lamellaire que doivent être recherchés les pigments et les systèmes enzymatiques responsables des premières étapes de la photosynthèse. Les pigments sont assez peu nombreux et ont des propriétés qui les différencient. La diversité des couleurs provient des proportions dans lesquelles ils s'associent. Dans tous les végétaux on retrouve toujours de la chlorophylle *a*, l' $\alpha$  ou le  $\beta$ -carotène et des xanthophylles (lutéine, zéaxanthine ou violaxanthine).

La chlorophylle *a* a été considérée jusqu'à ces dernières années comme le seul pigment intervenant dans le cycle photochimique de la réaction primaire de la photosynthèse, aussi a-t-elle été particulièrement étudiée; les travaux de FRENCH et ELLIOTT (1958), d'ALLEN, FRENCH et BROWN (1960), de KOK (1959) et de BROWN (1962), ont montré que l'absorption de la chlorophylle *a* vers 682 m $\mu$  est complexe, on y distingue en fait plusieurs sommets à 670 m $\mu$ , 705 m $\mu$  et même 710 m $\mu$ .

A côté de la chlorophylle *a* constamment présente, il existe d'assez nombreux pigments parfois caractéristiques des divers groupes d'Algues : la chlorophylle *b* chez les Chlorophycées et chez les Végétaux vasculaires, la chlorophylle *c* chez les Diatomées et les Phéophycées, la chlorophylle *d* chez certaines Rhodophycées, et les xanthophylles telles que la fucoxanthine des Phéophycées, la dinoxanthine des Péridiniens, etc. Les formules pigmentaires les plus complexes se trouvent chez les Rhodophycées et les Cyanophycées où une troisième catégorie de pigments, les biliprotéines sont synthétisées. Les biliprotéines comprennent aussi plusieurs types de pigments (B, R et C-phycocyanines et allophycocyanine).

Le rôle de ces pigments s'est révélé différent de celui qu'on leur supposait autrefois. Les spectres d'action de fluorescence et de photosynthèse mettent en évidence que l'énergie lumineuse qui leur est fournie par excitation directe est transférée à la chlorophylle *a*. Mais leur fonction ne se limite peut-être pas à ce simple transfert. Il est possible qu'ils participent plus ou moins directement à l'une des réactions photochimiques de la photosynthèse. On sait, en effet, depuis les travaux d'EMERSON, CHALMERS et CEDERSTRAND (1957), DUYSSENS (1963), KOK et HOCH (1963), WITT, MÜLLER et RUMBERG (1963), FRENCH et FORK (1963) que la photosynthèse requiert la participation de plusieurs systèmes pigmentaires absorbant à des longueurs d'onde différentes et réalisant au moins deux réactions photochimiques.

L'étude de la fluorescence *in vivo* a apporté aussi des arguments sur la nature ou l'état des pigments, ainsi LAVOREL (1957), BRODY (1958) ont émis l'hypothèse que la chlorophylle *a* pouvait se trouver en partie à l'état condensé (dimérisé ou polymérisé) et serait responsable de la fluorescence observée à 717-720 m $\mu$ . Le développement de méthodes nouvelles et les apports de très nombreuses recherches ont beaucoup modifié ces dernières années l'aspect du problème de la photosynthèse, aussi le but de ce travail a-t-il subi des changements notables. Depuis longtemps la physiologie des Algues a été particulièrement étudiée avec *Chlorella*, *Euglena*, *Porphyridium cruentum* et avec quelques Algues brunes, *Navicula*, *Pheodactylum tricornutum* et plus récemment *Ochromonas*, mais les exemples sont peu nombreux. Il était donc intéressant d'apporter un matériel nouveau. Des algues ont été isolées et cultivées dans ce but. Deux principalement ont été choisies : une Rhodophycée unicellulaire marine *Rhodospirillum rubrum* GEITLER (voir GIRAUD, 1958, 1959) et une Chrysophy-

cée marine *Stichochrysis* sp. (1). Ces microorganismes donnent des cultures homogènes et des lots d'expérience aisément reproductibles. Ils permettent aussi des mesures statistiques sur des structures identiques, ce qui n'est généralement pas réalisé avec les Végétaux multicellulaires.

L'étude pigmentaire de ces algues s'est révélée assez complexe, elle a été suivie par une étude de leur fluorescence *in vivo* et de leur photosynthèse. Les deux phénomènes sont suffisamment dépendants l'un de l'autre pour qu'on ne puisse les séparer. Les variations de la fluorescence et de la photosynthèse sont en général antiparallèles. La fluorescence permet d'étudier les variations des transferts d'énergie entre les pigments, en particulier chez les Algues rouges où le spectre visible est couvert d'un bout à l'autre par leurs diverses bandes d'absorption. La fluorescence permet aussi de mettre en évidence les pigments présents en faible quantité lorsqu'ils absorbent la lumière de radiations éloignées dans le rouge car ils bénéficient alors de l'énergie transférée par les autres pigments ; c'est le cas du pigment fluorescent vers 720 m $\mu$  visible chez *Rhodorus* et *Stichochrysis* (GIRAUD, 1960, 1961). L'effet de différents facteurs sur les transferts d'énergie chez *Rhodorus* montre une grande labilité des liaisons entre les molécules de biliprotéines et la chlorophylle. On est donc amené à poser le problème de la répartition spatiale de ces pigments les uns par rapport aux autres ; c'est ce qui a motivé l'étude des infrastructures des plastes en microscopie électronique (GIRAUD, 1962, 1963). Plus généralement, on peut considérer le problème de la répartition des pigments dans le plaste. Avec la microscopie électronique, on observe des structures définies. Dans quelle mesure sont-elles représentatives de l'appareil photosynthétique ? Les enzymes qui interviennent dans les phénomènes primaires de la photosynthèse sont-ils aussi localisés de façon déterminée par rapport à la chlorophylle ? Autant de questions délicates qui se posent.

La liaison entre les phénomènes physiologiques et les structures responsables n'a pu être faite que rarement. WOLKEN et SCHWERTZ (1953) ont bien étudié la répartition de la chlorophylle chez *Euglena*, BRODY et VATTER (1959) ont essayé de préciser la localisation des biliprotéines de *Porphyridium*. Dans les deux cas, la présence de la chlorophylle sur les lamelles est certaine, mais on ne peut guère apporter de précisions supplémentaires sur cette localisation et ses relations fonctionnelles avec les systèmes enzymatiques de l'appareil photosynthétique.

Chez les Végétaux supérieurs, PARK et PON (1961, 1963) ont décrit récemment des unités granulaires composant les lamelles, les *quantasomes*. Ces globules lipoprotéiques sont rendus visibles par des méthodes d'ombrage et peuvent être rapprochés de ceux décrits par FREY-WYSSLING et STEINMANN (1953), malgré leur taille assez différente. Il était intéressant de retrouver ces résultats sur les chloroplastes isolés de Maïs par la nouvelle méthode de coloration négative. Les essais s'étant montrés positifs, cette technique a été ensuite appliquée au cas des plastes isolés des algues utilisées dans ces recherches.

Les observations de microscopie électronique ont porté essentiellement, dans ce travail, sur la structure lamellaire. Pour cela, il était nécessaire de se reporter à un cas plus connu, aussi les différentes méthodes ont-elles été essayées sur les chloroplastes de Maïs avant d'être appliquées aux Algues.

---

(1) dénommée ainsi par analogie avec *Stichochrysis immobilis* (PRINGSHEIM, 1955).

L'apport de la microscopie électronique à la connaissance physiologique est illustré par l'exemple de la réaction de MOLISCH qui, grâce au précipité d'argent formé au niveau des chloroplastes, est bien visible sur coupe ultrafine. Cette réaction, qui se produit à la lumière et *in vivo*, a permis des interprétations concernant la structure et le fonctionnement de l'appareil photosynthétique (GIRAUD, 1963).

L'exposé de ce travail comprendra donc, après un aperçu sur les conditions expérimentales et les méthodes employées, une partie physiologique, une partie structurale et enfin une partie où la localisation des phénomènes physiologiques est étudiée à l'aide de la microscopie électronique. Les résultats de ces dernières observations conduisent à discuter les hypothèses relatives à la répartition des pigments dans les plastes et les rapports fonctionnels qu'ils ont entre eux.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### A. — MATÉRIEL ET CONDITIONS DE CULTURE

La plus grande partie de ce travail concernant la photosynthèse et la fluorescence a été faite à partir des cultures de *Rhodosorus marinus* GEITLER et de *Stichochrysis* sp. Diverses algues ont été étudiées également soit à titre de comparaison soit parce que leurs propriétés sont mieux adaptées aux expériences entreprises. Les Rhodophycées sont un matériel difficile à cause de leur faible résistance aux conditions de survie au laboratoire qui ne permet pas des études prolongées. Les hasards des récoltes font aussi que de nombreuses espèces ont été utilisées.

Parmi les Bangiales, *Porphyra umbilicalis* (LINNÉ) KUNTZING, *Porphyra linearis* GREVILLE, récoltées à Roscoff et *Porphyridium cruentum* (SM. et SOUV.) NAGELI, souche isolée à partir de prélèvements de Chrysophycées des falaises calcaires d'Etretat, permettent de préciser la structure des plastes et des pyrénoïdes. *Rhodomela subfusca* C. AGARDII = *Rhodomela confervoïdes* (HUDSON) SILVA, *Polysiphonia elongata* (HUDSON) HARVEY, récoltées à Roscoff, sont des algues favorables pour obtenir des plastes isolés, car leurs cellules sont de grande taille et ont une membrane mince, deux caractères que l'on ne retrouve pas chez le *Rhodosorus*.

La structure siphonnée de *Codium tomentosum* STACKHOUSE — *Codium dichotomum* (HUDSON) S.F. GRAY (Chlorophycée, Codiale) oppose moins d'obstacle à l'extraction des plastes que la structure cellulaire.

Une Rhodophycée d'eau douce récoltée à Cauville, près d'Etretat, *Batrachospermum* sp. possède des plastes très régulièrement disposés dans la longueur de la cellule et a permis de bonnes observations et des mesures précises. Par suite de leur composition pigmentaire simple et de l'absence d'amidon, les plastes d'une *Vaucheria* sp. (Xanthophycée), récoltée dans les bassins de l'Ecole Normale Supérieure à Paris, ont été utilisés comme terme de comparaison dans l'étude de la structure lamellaire.

Les souches unialgales ont été isolées dans de l'eau de mer enrichie de sels nutritifs, puis transférées sur milieu synthétique minéral dont la composition est donnée dans le tableau I. L'isotonie de l'eau de mer et l'équilibre ionique sont réalisés par les quatre premiers sels minéraux, énumérés dans le tableau I. Les sels nutritifs comprennent  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  et les oligoéléments du milieu de HUTNER (d'après MYERS, PHILLIPS et GRAHAM, 1951) mais en concentrations légèrement différentes.

TABLEAU I

Composition du milieu de culture

| Sels minéraux principaux                               | g/l | Oligoéléments                                           | mg/l |
|--------------------------------------------------------|-----|---------------------------------------------------------|------|
| 1) NaCl                                                | 25  | 3) $H_3BO_3$                                            | 29   |
| MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O                 | 5   | ZnSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O                  | 22   |
| KCl                                                    | 1   | FeSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O                  | 14   |
| CaCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O                 | 0,5 | MnCl <sub>2</sub> , 4 H <sub>2</sub> O                  | 3,5  |
| 2) NaNO <sub>3</sub>                                   | 1   | MoO <sub>3</sub>                                        | 1,5  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 12 H <sub>2</sub> O | 0,2 | CuSO <sub>4</sub> , 5 H <sub>2</sub> O                  | 4    |
|                                                        |     | Co (NO <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> , 6 H <sub>2</sub> O | 1    |
|                                                        |     | 4) EDTA (sel de sodium)                                 | 10   |

Les sels des métaux lourds sont stabilisés par adjonction du sel de sodium d'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA).

Le pH est ajusté à 7,8, après stérilisation à l'autoclave, par addition de quelques ml d'une solution de  $K_2CO_3$  4*M*. Un fort barbotage d'air renfermant 0,2 % de  $CO_2$  permet une bonne agitation du milieu et empêche la formation d'amas cellulaires. L'apport de  $CO_2$  modifie le pH de début, on le réajuste après une heure de mise en culture. La formation de précipité est difficile à éviter, aussi la quantité de  $CaCl_2$  fournie est-elle réduite parfois jusqu'à 0,2 g/l.

Les éclaircements sont compris entre  $1,5 \times 10^3$  et  $2,5 \times 10^4$  ergs  $\cdot$  s<sup>-1</sup>  $\cdot$  cm<sup>-2</sup>.

Les cultures *au repos* sont placées à un éclairciment plus faible dans un milieu où les sels nutritifs sont dix fois moins concentrés. Elles peuvent être conservées dans ces conditions pendant plusieurs mois.

Pour le *Rhodosorus*, la température de croissance optimale se situe aux environs de 20 °C. Les cellules meurent au-dessus de 28 °C. Ce fait est vérifié pour de nombreuses algues marines (cf. BIEBL, 1962). Les espèces sublittorales de la zone tempérée ne supportent pas les températures supérieures à 27-30°C.

La tolérance de *Rhodosorus* vis-à-vis de la pauvreté en sels du milieu est très faible. Un milieu à 24 g/l ne permet pas son développement. La présence d'ions  $Ca^{++}$  est indispensable, de même que celle des ions  $K^+$ , mais le rapport  $\frac{Na^+}{K^+}$  est égal à 20 dans le milieu utilisé.

Les pH inférieurs à 7 sont très défavorables, par contre le pH 8,5 est bien toléré. Au début de la culture le volume d'algue double en 55 heures environ. Son temps de génération est donc très grand.

Pour *Stichochrysis*, l'étude des conditions de culture a été faite par MICHARD (1960). Cette algue, très euryhaline, supporte des variations de salinité allant de 10 g/l à 64 g/l. Sa croissance est assez lente, le volume initial double en 4 jours. Les exigences de pH et d'aliments sont semblables à celles de *Rhodosorus*.

Les deux algues peuvent être cultivées sur milieu gélosé. Elles forment lentement des colonies circulaires, très épaisses chez *Rhodosorus*. Celles-ci ont été conservées quelques mois bactériologiquement pures après passage dans des solutions de streptomycine à 1 %. Placé à l'obscurité, *Rhodosorus* croît alors en synthétisant ses pigments.

Les essais de purification de la souche de *Stichochrysis* ont été infructueux, les cellules étant sensibles aux faibles doses d'antibiotiques.

Les cultures éclairées par tubes PHILIPS fluorescents verts, jaunes et bleus à énergie incidente égale ont montré que la croissance du *Rhodorus* est optimale en lumière jaune, c'est-à-dire dans la zone d'absorption des biliprotéines. Les mesures de l'intensité photosynthétique en lumière colorée confirment que les radiations absorbées par les biliprotéines sont mieux utilisées que celles absorbées principalement par la chlorophylle *a* (CHAMPIGNY, 1959).

La croissance du *Rhodorus marinus* est très accrue lorsqu'on ajoute au milieu des facteurs de croissance, notamment la vitamine B<sub>12</sub> (PROVASOLI et FRIES, communications personnelles).

## B. — MÉTHODES D'ÉTUDE DES PIGMENTS

### 1. Extraction et dosage des pigments

On distinguera les méthodes employées pour les pigments liposolubles d'une part et pour les pigments hydrosolubles d'autre part.

*a)* Les extractions des pigments liposolubles sont faites après broyage au mortier avec de la poudre de verre (diamètre moyen 100  $\mu$ ) dans le méthanol ou le mélange acétone 80 % — eau 20 %. Cette méthode donne de bons résultats avec *Stichochrysis* pour lequel l'extraction dure une heure ; avec *Rhodorus*, par contre, elle dure une journée. Elle est facilitée par une déshydratation préalable des cellules, soit par dessiccation partielle, soit par lavage rapide dans le méthanol. Ce solvant est bien meilleur que l'acétone pour extraire la chlorophylle des Rhodophycées.

La séparation des pigments est faite par chromatographie. Les caroténoïdes totaux sont obtenus après saponification des chlorophylles.

Les extraits de *Stichochrysis* sont chromatographiés sur colonne de sucre selon la méthode de STRAIN (1958), car la fucoxanthine s'élue mal sur colonne de cellulose. On peut cependant les étudier après séparation de la fucoxanthine et des chlorophylles entre l'éther de pétrole et le méthanol.

L'analyse quantitative est faite à partir des coefficients d'extinction de MAC KINNEY (1941) pour la chlorophylle et les caroténoïdes habituels (lutéine,  $\beta$ -carotène) ; pour le dosage de la fucoxanthine, on a utilisé le coefficient d'extinction  $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 110$  à 450  $\mu$  dans l'hexane (cf. GOODWIN, 1955).

*b)* L'extraction totale des biliprotéines est souvent très difficile. Les meilleurs résultats sont obtenus soit par désintégration des cellules à l'oscillateur sonique « Raythéon » 10 kHz, soit à la suite de l'éclatement des cellules par passages répétés dans l'azote liquide et réchauffement, soit encore par broyage dans un microbroyeur DANGOU MAU. Lorsque les cellules sont simplement tuées et désorganisées, les pigments passent dans le milieu tamponné à pH 6,1 à des vitesses différentes. La phycocyanine est plus lente à sortir. La purification des extraits totaux est faite par précipitation au moyen de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Ces pigments sont séparés sur colonne de phosphate tricalcique selon la méthode de SWINGLE et TISELIUS (1951). La colonne est d'abord lavée avec une solution de chlorure de sodium à 1 %. L'élution est faite avec des concentrations croissantes de la solution de tampon phosphate à pH 6,1 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

La phycoérythrine est éluee avant la phycocyanine. Le rendement de la séparation est de 60 % environ.

Un pigment reste au sommet de la colonne, fortement adsorbé. Il peut être élué avec une solution de tampon phosphate pH 7. Son spectre d'absorption est celui de l'allophycocyanine. Les dosages de la phycoérythrine et de la phycocyanine sont faits spectroscopiquement en prenant comme coefficient d'extinction pour la première  $E = 2,7$  et pour la deuxième  $E = 7,9$  (cf. BRODY et BRODY, 1961).

Les mesures d'absorption sont faites au spectrophotomètre JOBIN-YVON. Quelques mesures concernant les spectres *in vivo* ont pu être obtenues avec des spectrophotomètres enregistreurs PERKIN ELMER et CARY 14.

Les suspensions d'algues sont homogénéisées à l'appareil POTTER. Elles sont alors maintenues homogènes par addition de 50 % de dextran à 0,3 g/ml. Les faces des cuves vers le photorécepteur sont recouvertes par des lames opalines ou des bandes de papier translucide selon la méthode de SHIBATA (1958).

## 2. Etude de la fluorescence et de la photosynthèse

Les mesures de fluorescence sont faites sur un montage comprenant une source lumineuse (lampe PHILIPS SP 500) qui éclaire en lumière parallèle des filtres monochromatiques ( $\Delta\lambda = 12 \text{ m}\mu$ ). L'image de la source est obtenue sur un tube capillaire vertical entouré d'une gaine thermostatique qui contient la suspension d'algues. La fluorescence est recueillie à angle droit par un monochromateur à réseau (dispersion  $6,6 \text{ m}\mu/\text{mm}$ ) et analysée par un photomultiplicateur DU MONT (n° 6911).

Un dispositif enregistreur permet d'obtenir directement les courbes représentant les spectres de fluorescence.

Les mesures sont faites sur des suspensions diluées de concentrations variables afin d'éliminer les effets intercellulaires de réabsorption.

Les études de fluorescence ont également porté sur des plastes isolés d'algues. Le milieu de broyage et de centrifugation est constitué par le liquide de culture additionné à un volume égal de solution tampon Tris-maléate 0,2 M et saccharose 0,8 M.

Si les cellules de Floridées sont bien détruites par passage au *mixer*, celles de *Stichochrysis* ou de *Rhodorus* sont simplement dissociées les unes des autres ; on doit donc les broyer au mortier avec des billes de verre ou les passer au désintegrateur ultrasonique MSE MULLARD. La première centrifugation à 200 G pendant 15 mn donne un culot formé de débris cellulaires et de cellules entières. Les plastes sont recueillis après centrifugation à 2 000 G pendant 20 mn. Il reste un surnageant formé d'une très fine suspension pigmentée.

Le contenu des extraits est contrôlé au microscope. Leur pureté est plus grande dans le cas de *Stichochrysis* que dans celui des Rhodophycées où les cellules étant de taille très diverse, les fragments obtenus n'ont pas de dimensions bien définies et ne peuvent être séparés par centrifugation différentielle.

Les mesures de dégagement d'oxygène sont faites par la méthode polarographique avec l'électrode à membrane décrite par DE KOUCHKOVSKY (1963) dans un montage semblable. Les algues sont mises en suspension dans une solution composée de 50 % de milieu et 50 % de tampon WARBURG n° 11 (pH 8,7).

## C. — MÉTHODES D'ÉTUDE CYTOLOGIQUE

Le contrôle de la microscopie photonique a toujours été employé, mais cette étude *in vivo* n'apporte pas de renseignements très importants étant donné les faibles dimensions des cellules. La microscopie électronique est par contre parfaitement adaptée à ces observations cytologiques.

## 1. Méthodes d'étude en microscopie électronique

Le permanganate de potassium et le tétr oxyde d'osmium tamponné (pH 7,5) sont les deux fixateurs principaux employés. Les temps de fixation furent d'une demi-heure pour le permanganate et d'une heure ou une heure et demie pour le tétr oxyde d'osmium. Dans ce dernier cas, les coupes ont été « colorées » c'est-à-dire contrastées à l'acétate d'uranyle ou au permanganate de potassium.

Les algues unicellulaires sont centrifugées après fixation et incluses dans la gélose à 1 % formolée.

Les inclusions sont faites à l'araldite, selon la méthode de LUFT (1961). Les observations sont faites aux microscopes RCA, EMU 3 F et 3 C.

Les expériences sur la réaction de MOLISCH ont montré que le nitrate d'argent à 1 % fixe le matériel végétal. On peut ensuite contraster les coupes par une « coloration électronique » à l'acétate d'uranyle. Le permanganate de potassium dissout le précipité d'argent. BROWN, MOLLENHAUER et JOHNSON (1962) ont étudié cette réaction de réduction du nitrate d'argent sans fixation postérieure du matériel ou avec une fixation osmique à 1 %. Les structures non soulignées par le précipité d'argent ne sont pas visibles sur leurs photographies, ce qui ne permet pas un repérage très précis de la réaction.

Pour obtenir un meilleur résultat, il suffit de diminuer la concentration de la solution de nitrate d'argent jusqu'à 0,25 % dans le cas du *Rhodospirillum rubrum* et d'ajouter, au bout de 1 ou 2 minutes une solution de tétr oxyde d'osmium dont la concentration finale est de 0,1 %. A la fin de l'illumination, le matériel végétal est lavé et remis dans la solution de tétr oxyde d'osmium à 0,1 %. Par cette méthode les infrastructures lamellaires des plastides sont bien visibles. De bonnes observations ont aussi été faites avec des chloroplastes de Maïs immergés dans  $\text{AgNO}_3$  à 0,5 %.

La technique de coloration négative a été également utilisée (cf. THIERY, 1961). Une solution d'acide phosphotungstique à 2 % tamponnée (pH 7) contenant en suspension les particules à étudier, est pulvérisée sur une grille d'observation. Celle-ci est recouverte par une membrane de carbone. La couche de carbone est obtenue par vaporisation sous vide avec un évaporateur EDWARDS.

## 2. Précision des mesures obtenues à partir des photographies de microscopie électronique

Les photographies servent pour des observations morphologiques, mais aussi pour des mesures. Celles-ci peuvent être entachées d'erreur, même si l'on suppose que la préparation est mince (400 à 500 Å). Les conditions d'observations peuvent conduire à des artefacts. La focalisation de l'appareil n'est pas toujours parfaite et la précision dans le calcul des grossissements est de l'ordre de  $\pm 5\%$ . D'autres causes d'erreur peuvent provenir aussi du matériel observé : l'épaisseur des coupes, la plus ou moins bonne conservation des structures ou leurs modifications de taille sous l'action de l'agent fixateur et des opérations d'imprégnation.

Dans le cas de la coloration négative, des artefacts s'observent lorsque le matériel étudié n'est pas fixé (figures myéliniques dues aux lipides du chloroplaste).

Les mesures sont faites sur des micrographies dont le grandissement est de 100 000 ou 200 000.

Les valeurs moyennes des différentes mesures qui sont données dans le cours de ce travail doivent être considérées comme approximatives, car elles sont entachées d'une erreur systématique difficilement appréciable.

Il est nécessaire d'adopter une marge d'erreur assez grande. Pratiquement deux moyennes de mesures seront considérées comme distinctes lorsqu'elles diffèrent d'au moins 30 %.

## ÉTUDE DES PIGMENTS PHOTOSYNTHÉTIQUES DE *RHODOSORUS MARINUS* ET DE *STICHOCHRYSIS* *sp.*

### A. — ÉTUDE DES PIGMENTS

L'analyse de la composition pigmentaire des plastes est une première étape dans l'étude physiologique de l'appareil photosynthétique. *Rhodosorus marinus* et *Stichochrysis* *sp.* possèdent en plus de la chlorophylle *a* des phycobilines pour la Rhodophycée, de la fucoxanthine et diverses chlorophylles pour la Chrysophycée. L'étude pigmentaire qualitative et quantitative est réalisée à partir des extraits. L'étude des spectres d'absorption *in vivo* des suspensions d'algues donne des renseignements complémentaires.

#### 1. Les pigments de *Rhodosorus marinus*

La figure 1 indique les spectres d'absorption des pigments et des algues *au repos*. La fraction liposoluble est de composition assez simple comme chez la plupart des Rhodophycées. Il n'existe qu'une chlorophylle : la chlorophylle *a*. La chlorophylle *d* n'a pu être mise en évidence. Le  $\beta$ -carotène et la lutéine sont les seuls caroténoïdes qui aient été isolés.

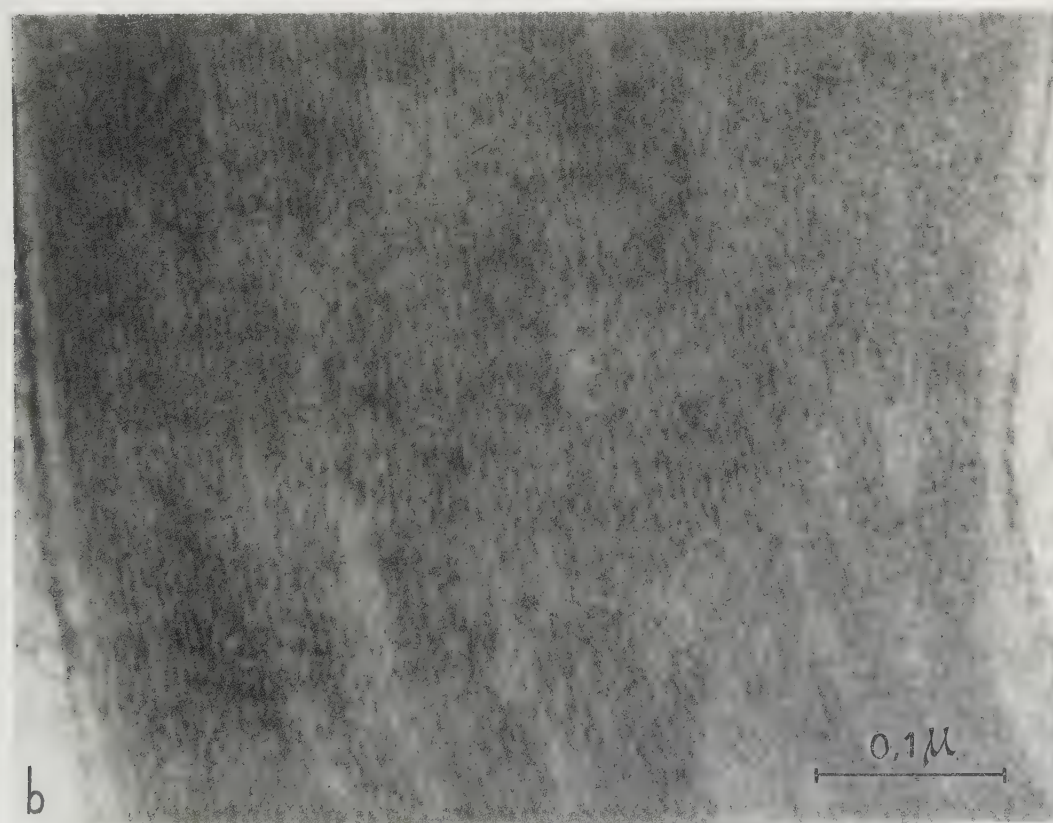
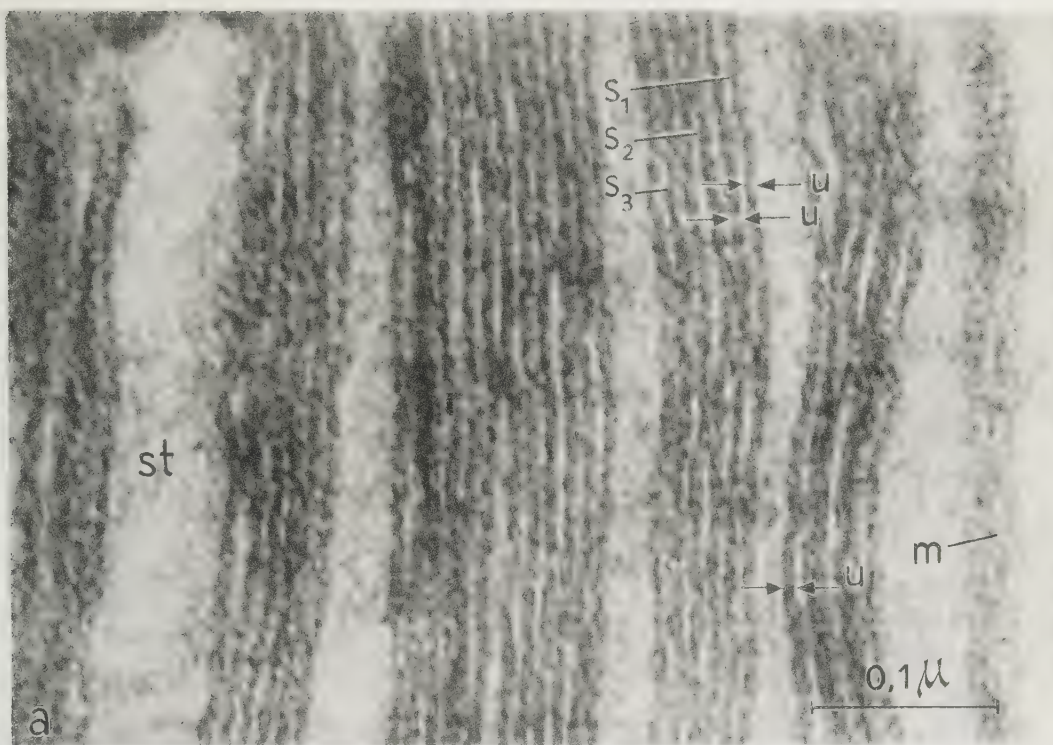
La chlorophylle représente 0,4 à 0,7 % du poids de substance sèche et les caroténoïdes totaux 0,03 à 0,16 %.

*On trouve en moyenne  $1,7 \times 10^8$  molécules de chlorophylle par cellule et  $1 \times 10^8$  molécules de caroténoïdes soit environ deux molécules de chlorophylle pour une de caroténoïde.*

La fraction hydrosoluble comprend de la phycoérythrine, de la phycocyanine et de l'allophycocyanine; ces trois pigments sont caractérisés par leur spectre d'absorption (voir fig. 2).

### PLANCHE I

- a. Vue partielle d'un plaste de *Vaucheria* montrant les saccules groupés par trois,  $s_1, s_2, s_3$ . Ils sont composés chacun de deux unités membranaires, *u*, dont la structure tripartite (deux couches denses séparées par une couche claire) est visible entre les flèches ; *st* stroma ; *m*, membrane du plaste. Fixation au permanganate de potassium ;  $\times 250\ 000$ .
- b. Vue, à un même grossissement, des lamelles dans un plaste de *Stichochrysis*. Les faisceaux de lamelles sont très serrés, on distingue difficilement leurs limites. Fixation au permanganate de potassium.  $\times 250\ 000$ .





Le spectre de la phycoérythrine comporte deux sommets seulement, un sommet principal à 540  $m\mu$  et un second légèrement moins haut à 565  $m\mu$  ce qui la caractérise comme une B-phycoérythrine identique à celle de *Porphyridium cruentum*, alors que la R-phycoérythrine présente un sommet supplémentaire aigu à 500  $m\mu$ . La B-phycoérythrine a été trouvée uniquement dans les groupes des Bangiales et des Nema- lionales et semble les caractériser.

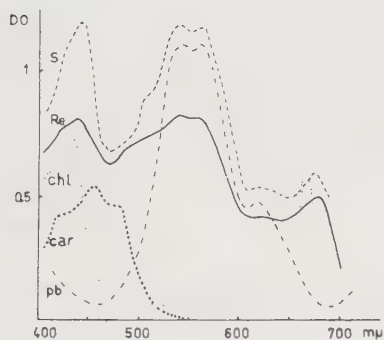


FIG. 1. — Spectres d'absorption des pigments de *Rhodorus marinus*.

- Re : spectre d'absorption pour un équivalent d'un milligramme d'algues sèches par millilitre de suspension.  
 chl : spectre de la solution correspondante de chlorophylle *a*.  
 car : spectre des solutions correspondantes de caroténoïdes totaux.  
 pb : spectre de l'extrait aqueux.  
 S : courbe calculée à partir des extraits.

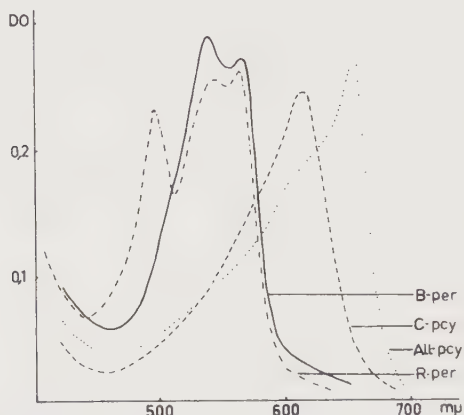


FIG. 2. — Spectre d'absorption des phycobilines de *Rhodorus marinus*.

- B-per : spectre de la B-phycoérythrine avec ses deux sommets à 540  $m\mu$  et 565  $m\mu$ , pH 6,1.  
 C-psy : spectre de la C-phycocyanine, pH 6,1.  
 All-psy : spectre de l'allophycocyanine, pH 7.  
 R-per : spectre de la R-phycoérythrine de *Rhodomela subfusca*, sur lequel on remarque le pic d'absorption supplémentaire à 500  $m\mu$ .

Le spectre de la phycocyanine n'a qu'un seul pic à 615  $m\mu$  ce qui est caractéristique de la C-phycocyanine.

L'existence de la R-phycocyanine est d'ailleurs contestée par HATTORI et FUJITA (1959) qui la considèrent comme un mélange de C-phycocyanine et de phycoérythrine. On constate en effet que selon les colonnes de chromatographie on observe un pic accessoire à 565  $m\mu$  plus ou moins important. Quand la phycocyanine est bien purifiée, ce pic a presque totalement disparu.

Il n'existerait donc qu'une seule phycocyanine, commune aux Rhodophycées et aux Cyanophycées.

Le spectre d'absorption de l'allophycocyanine possède un sommet à  $645\text{ m}\mu$ , il est identique à celui donné par O'h EOCHA (1958) pour *Porphyridium cruentum* et par HATTORI et FUJITA (1959) pour *Tolypothrix tenuis* (Cyanophycée) et *Porphyra tenera*. La présence de ce pigment n'est pas caractéristique, car il est très répandu dans les deux groupes d'Algues à phycobilines.

Le pigment hydrosoluble le plus important quantitativement est la phycoérythrine qui représente 85 % des biliprotéines, la phycocyanine en constitue 14 % et l'allophycocyanine 1 % environ. Les extractions n'étant pas totales, il est difficile de donner des proportions plus exactes. On peut estimer à  $2 \times 10^7$  le nombre de molécules de biliprotéines par cellules, soit  $6,4 \times 10^8$  chromophores si l'on suppose avec BRODY ET BRODY (1961) qu'il y a 32 chromophores par molécules protéiques (voir GIRAUD, 1962).

Ces résultats seront utilisés pour discuter les possibilités de localisation des biliprotéines dans les plastes.

Le spectre d'absorption des suspensions de cellules de *Rhodorus* recouvre à peu près entièrement le spectre visible. On note, cependant, les trois zones principales d'absorption à  $440\text{ m}\mu$ ,  $565\text{ m}\mu$  et  $675\text{ m}\mu$ . Elles correspondent à la chlorophylle *a*

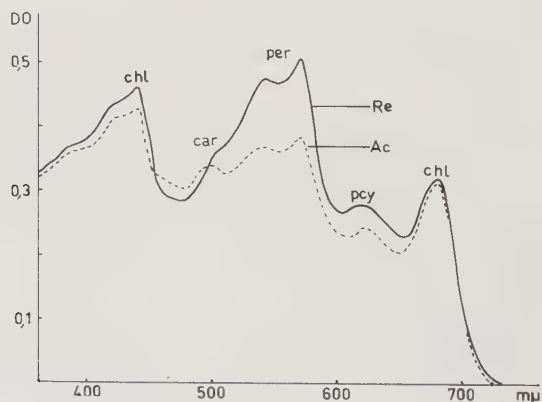


FIG. 3. — Spectre d'absorption *in vivo* des suspensions de *Rhodorus marinus*.

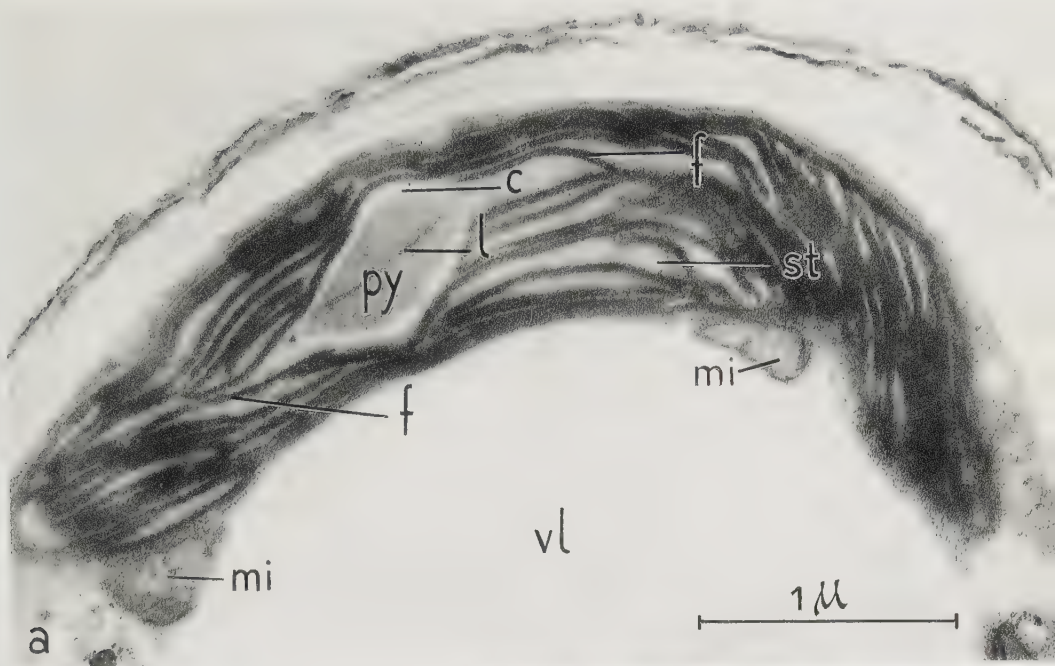
Re : pour une suspension d'algues au repos.

Ac : pour une suspension d'algues en culture accélérée.

chl : chlorophylle *a* ; car : caroténoïdes ; per : phycoérythrine ; pcy : phycocyanine.

## PLANCHE II

- a. Plaste de *Stichochrysis* dont le pyrénioïde *py*, au centre, est traversé par une lamelle *l*. Les faisceaux de lamelles *f* sont ici bien séparés les uns des autres par le stroma *st*. On observe dans le pyrénioïde la zone sombre centrale et la couche claire *c* périphérique ; dans le cytoplasme, mitochondrie *mi* ; vacuole à leucosine *vl*. Fixation au permanganate de potassium.  $\times 34\ 000$ .
- b. Extrémité très agrandie d'un plaste de *Stichochrysis*. On observe un faisceau de lamelles périphérique *fp* qui longe la membrane *m* du plaste. D'autres faisceaux *f* se terminent dans cette zone, on y distingue en général six couches denses séparées par des couches claires formant en tout trois saccules ; en *e* extrémité fermée de ces saccules. Fixation au permanganate de potassium.  $\times 250\ 000$ .





t à la phycoérythrine. L'identification de ces bandes est simple à partir des extraits, compte tenu du décalage des sommets qui existe toujours entre ces extraits et les pigments *in vivo*. La courbe S, figure 1 représente la somme des extraits partiels, elle est semblable au spectre d'absorption Re de la suspension. On constate l'existence d'une bosse à 500  $m\mu$  qui correspond aux caroténoïdes et d'un sommet secondaire vers 620  $m\mu$  qui est dû en partie à la phycocyanine et en partie à la chlorophylle *a*. L'allophycocyanine ne peut pas être distinguée. Les variations quantitatives de ces pigments se produisent en fonction de l'état de culture de l'algue.

En culture *accélérée*, on obtient un spectre de type Ac de la figure 3, révélant moins de phycobilines qu'*au repos* (20 à 30 % de moins environ). La quantité de chlorophylle par plaste reste par contre assez constante.

La synthèse des phycobilines semble donc être plus lente dans les conditions de culture *accélérée*.

Le rapport des absorptions  $\frac{\text{Phycobilines}}{\text{Chlorophylle}}$  égal à 1,6 pour les algues *au repos* et 1,2 seulement pour les algues en culture *accélérée*, varie d'ailleurs en fonction de l'éclairement, ainsi BRODY et EMERSON (1959) donnent pour *Porphyridium cruentum* un rapport allant de 1,45 à 2,20 en lumière blanche pour des énergies incidentes de  $1,4 \times 10^4$  à  $0,68 \times 10^3$  ergs  $s^{-1} \cdot cm^{-2}$ , voisines de la gamme utilisée ici.

A partir de la courbe des extraits partiels, on peut estimer pour chaque longueur d'onde la participation de chaque pigment à l'absorption, ce qui sera utile à connaître dans les expériences de photosynthèse.

Le *Rhodosorus* n'a donc pas une composition pigmentaire très différente de *Porphyridium cruentum*. Dans les algues au repos le pourcentage de phycocyanine semble pouvoir être plus élevé pour *Rhodosorus* (à peu près 20 % des phycobilines) que pour *Porphyridium* qui ne possède que 10 % de phycocyanine.

## 2. Les pigments de *Stichochrysis* sp.

L'équipement pigmentaire du *Stichochrysis* est caractérisé par l'abondance de l'ucocoxanthine dont le pic d'absorption *in vitro* dépasse toujours celui de la chlorophylle *a*, ce qui modifie le spectre d'absorption dans les courtes longueurs d'onde. Il existe, en plus de la chlorophylle *a*, de la chlorophylle *c* mais en très petite quantité. Celle-ci est décelable dans les extractions partielles au mélange méthanol-eau 1v/1v ou 7v/3v. Avec des mélanges où la proportion d'eau est plus forte, aucune extraction n'est possible. La proportion de chlorophylle *c* extraite par ce procédé est suffisamment importante pour qu'elle soit analysable. Ces extraits plus riches en chlorophylle *c* que l'extrait total ont été fractionnés sur colonnes de sucre. La chlorophylle *a* et les caroténoïdes passent d'abord, la chlorophylle *c* est éluée ensuite avec le mélange d'éther de pétrole-méthanol 9v/1v. Mais les faibles quantités recueillies ne permettent pas d'obtenir un bon spectre de la chlorophylle *c* qui est souvent mélangée à des produits de dégradation de la chlorophylle *a*.

La proportion de chlorophylle *c* extraite est différente selon les expériences. On peut caractériser sa présence par le rapport des densités optiques  $\frac{D.O. \text{ à } 630 m\mu}{D.O. \text{ à } 665 m\mu}$ . Ce rapport, égal à 0,35 pour la chlorophylle *a* seule, atteint les valeurs de 0,70, 1,40 et 2 pour les extraits partiels (fig. 4), la plus forte valeur étant obtenue dans le mélange méthanol-eau 7v/3v.

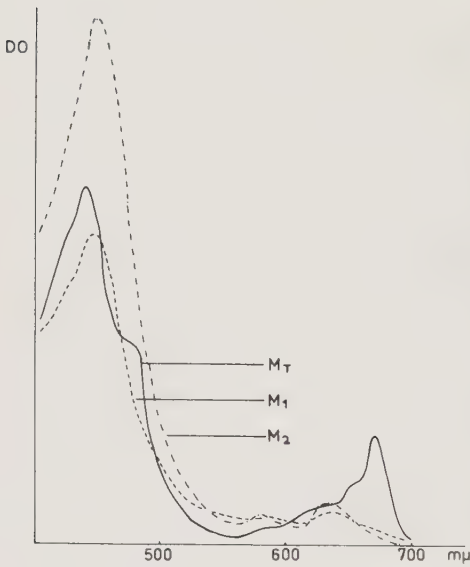


FIG. 4. — Extraction partielle des pigments de *Stichochrysis*.

Mt : extrait total au méthanol.  
 M<sub>1</sub> : extrait au mélange méthanol-eau 1v/1v.  
 M<sub>2</sub> : extrait au mélange méthanol-eau 7v/3v.

Les deux dernières courbes ont un pic d'absorption peu élevé dans le rouge et situé vers 630 mμ, ce qui caractérise la présence de chlorophylle *c* dans ces extraits.

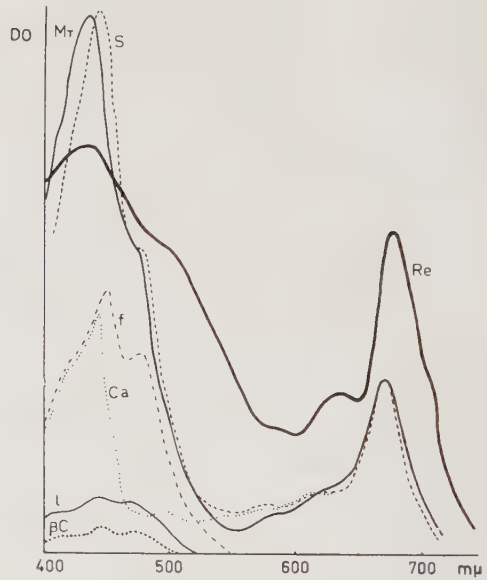


FIG. 5. — Composition pigmentaire de *Stichochrysis* sp. au repos.

Mt : extrait total au méthanol ; f, fucoxanthine ; Ca : chlorophylle *a*.

l : lutéine ; β-C, β-carotène ; S, somme des extraits partiels ; le décalage du sommet dans le bleu de la courbe S par rapport à la courbe Mt est dû à la présence de phéophytine *a* en grande quantité dans l'extrait total.

Re : spectre d'absorption des algues *in vivo*.

L'existence de la chlorophylle *c* chez les Chrysophycées est à noter. STRAIN (1958) la signale comme hypothétique dans ce groupe, sa présence n'a pas été confirmée par d'autres auteurs. La faible quantité du pigment rend son identification difficile.

Les extraits chlorophylliens de *Stichochrysis* ont toujours une grande proportion de phéophytine, même après une extraction rapide. Ce fait est à rapprocher des différents états de la chlorophylle décelable *in vivo*.

### PLANCHE III

- a. Cellule de *Batrachospermum* sp. ; au centre le noyau *N* et son nucléole *n* ; *pl*, plastes pariétaux limités par une membrane *m* doublée par une lamelle périphérique *lp* ; nombreuses mitochondries *mi* ; *er*, ergastoplasme parcourant le cytoplasme sur le pourtour de la cellule ; *sy*, bouton synaptique de structure complexe. Fixation au permanganate de potassium. × 20.000.
- b. Plastides de *Rhodomela subfusca* montrant des saccules *s* enroulés, disposés les uns dans les autres ; membrane du plaste *m*, globules lipidiques *gl*. Fixation au permanganate de potassium. × 100.000.

Les caroténoïdes du *Stichochrysis* ont été étudiés par MICHARD (1960). On y trouve du  $\beta$ -carotène, de la lutéine et de la fucoxanthine (voir fig. 5).

Le nombre de molécules de chlorophylle est de l'ordre de  $7,5 \times 10^8$ , celui des caroténoïdes varie de  $9 \times 10^8$  à  $1,4 \times 10^9$ . Il doit donc y avoir environ deux molécules de caroténoïdes pour une de chlorophylle.

Le spectre d'absorption de l'extrait total  $M_t$  peut être comparé à la courbe S, somme des extraits partiels ; on constate un décalage du sommet vers  $430 \text{ m}\mu$ , dû vraisemblablement à la présence de phéophytine *a* (voir fig. 5). L'examen *in vivo* montre que vers  $680 \text{ m}\mu$  où la chlorophylle *a* absorbe seule, on peut distinguer, comme pour *Rhodospirillum rubrum*, les algues *au repos* et les algues en culture *accélérée*. Ces dernières ont un spectre d'absorption dont le sommet dans le rouge est simple et se situe à  $676 \text{ m}\mu$ . Les algues *au repos*, au contraire, ont un pic d'absorption composite, sa largeur est plus grande et un épaulement est visible vers  $700 \text{ m}\mu$  (fig. 6).

Ce dernier est comparable à celui obtenu par FRENCH et ELLIOTT (1958) avec de vieilles cultures d'*Euglena*.

Chez *Stichochrysis*, la bosse à  $700 \text{ m}\mu$  est très importante, on peut préciser sa bande d'absorption propre par différence avec le spectre obtenu à partir d'algues en culture *accélérée*. On suppose que l'absorption maximale à  $676 \text{ m}\mu$  est la même dans les deux cas, ainsi qu'il est représenté dans la figure 6.

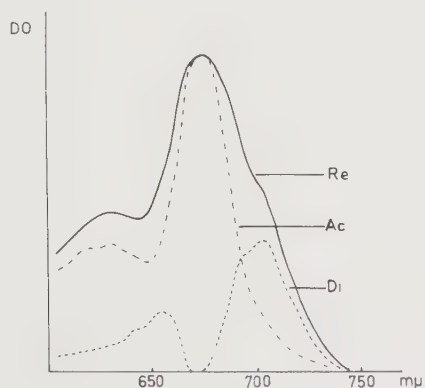


FIG. 6. — Spectres d'absorption des suspensions de *Stichochrysis* (bande dans le rouge).

- Ac : spectre des algues en culture *accélérée*, le pic de la chlorophylle à  $680 \text{ m}\mu$  est simple.
- Re : spectre des algues *au repos*, il présente un épaulement vers  $700 \text{ m}\mu$ .
- Di : différence des deux spectres qui met en évidence les composants  $C_a$  695 et  $P_a$  705, ainsi qu'une zone d'absorption vers  $645\text{--}655 \text{ m}\mu$ .

On détermine approximativement que le maximum de la courbe correspondant à cette différence se situe vers  $705 \text{ m}\mu$ . On constate souvent qu'elle-même possède un épaulement vers  $695 \text{ m}\mu$ . Cette méthode par différence ne peut pas donner de renseignements plus précis sur le pigment intéressé. On doit considérer que son absorption maximale est comprise entre  $695$  et  $705 \text{ m}\mu$ . Ce complexe pigmentaire est analogue à celui trouvé par FRENCH et ELLIOTT (1958). BROWN (1962) le considère comme composé de chlorophylle *a* absorbant à  $695 \text{ m}\mu$  et phéophytine *a* absorbant à  $705 \text{ m}\mu$  (en abrégé  $C_a$  695,  $P_a$  705).

Divers traitements physiques modifient cette zone du spectre. Ils ont été tentés pour isoler le complexe  $C_a$  695,  $P_a$  705.

Des extractions partielles au mélange méthanol-eau (lv/lv et 7v/3v) provoquent la disparition de  $C_a$  695,  $P_a$  705. Cependant, lorsque les algues sont remises en suspension, leur pic d'absorption simple se situe vers  $672\text{ m}\mu$  ; l'extrait ne contient aucun autre produit que la chlorophylle *a* et la chlorophylle *c*, qui ni l'une ni l'autre n'absorbent dans cette zone. Si les composants  $C_a$  695 et  $P_a$  705 sont des complexes chlorophylle-protéine ou phéophytine-protéine, ils sont détruits par le méthanol.

D'autres essais de séparation de  $C_a$  695,  $P_a$  705 par extraction fractionnée des plastides, ont donc été tentés ; ils peuvent préserver les relations pigment - protéine. Le pigment recherché ne se retrouve ni dans les spectres des culots à 200, 1 000, 3 000 *G*, ni dans le surnageant. La position du maximum d'absorption de ces différents lots est voisine de  $672\text{ m}\mu$ , celui de la chlorophylle *a* normale étant à  $682\text{ m}\mu$ , elle est donc légèrement déplacée vers les faibles longueurs d'onde, comme après une extraction partielle au méthanol.

Par contre, un traitement thermique de cinq minutes à  $40^\circ\text{C}$  ne fait pas disparaître  $C_a$  695,  $P_a$  705 ; ALLEN, FRENCH et BROWN (1960) signalent le contraire dans le cas d'*Ochromonas*.

La courbe d'absorption est encore différente dans la zone  $620\text{--}660\text{ m}\mu$ . Le spectre des algues *au repos* est plus complexe que celui des algues en culture *accélérée*. Il semble que l'on puisse mettre plusieurs bandes en évidence, notamment à  $640\text{ m}\mu$  et  $655\text{ m}\mu$ . L'imprécision de la méthode ne permet pas de tirer des conclusions plus complètes. On peut remarquer que l'absorption vers  $640\text{ m}\mu$  correspondrait, compte tenu du décalage des longueurs d'onde, à un pigment absorbant vers  $630\text{ m}\mu$ , donc peut-être à la chlorophylle *c*. A  $655\text{ m}\mu$ , FREI (1962) trouve une bande d'absorption d'un pigment inconnu, chez des algues étudiées à  $-180^\circ\text{C}$ .

On peut conclure pour *Stichochrysis* que la chlorophylle *a* se présente sous plusieurs formes. Elle peut se transformer en phéophytine  $P_a$  705, puisque pour BROWN (1962), la forme  $705\text{ m}\mu$  est une phéophytine, ce qui expliquerait la facilité avec laquelle on obtient cette substance lors des extractions au méthanol. La présence de ce complexe  $C_a$  695,  $P_a$  705 varie avec le mode de culture ; il se développe lentement dans les cultures *au repos*.

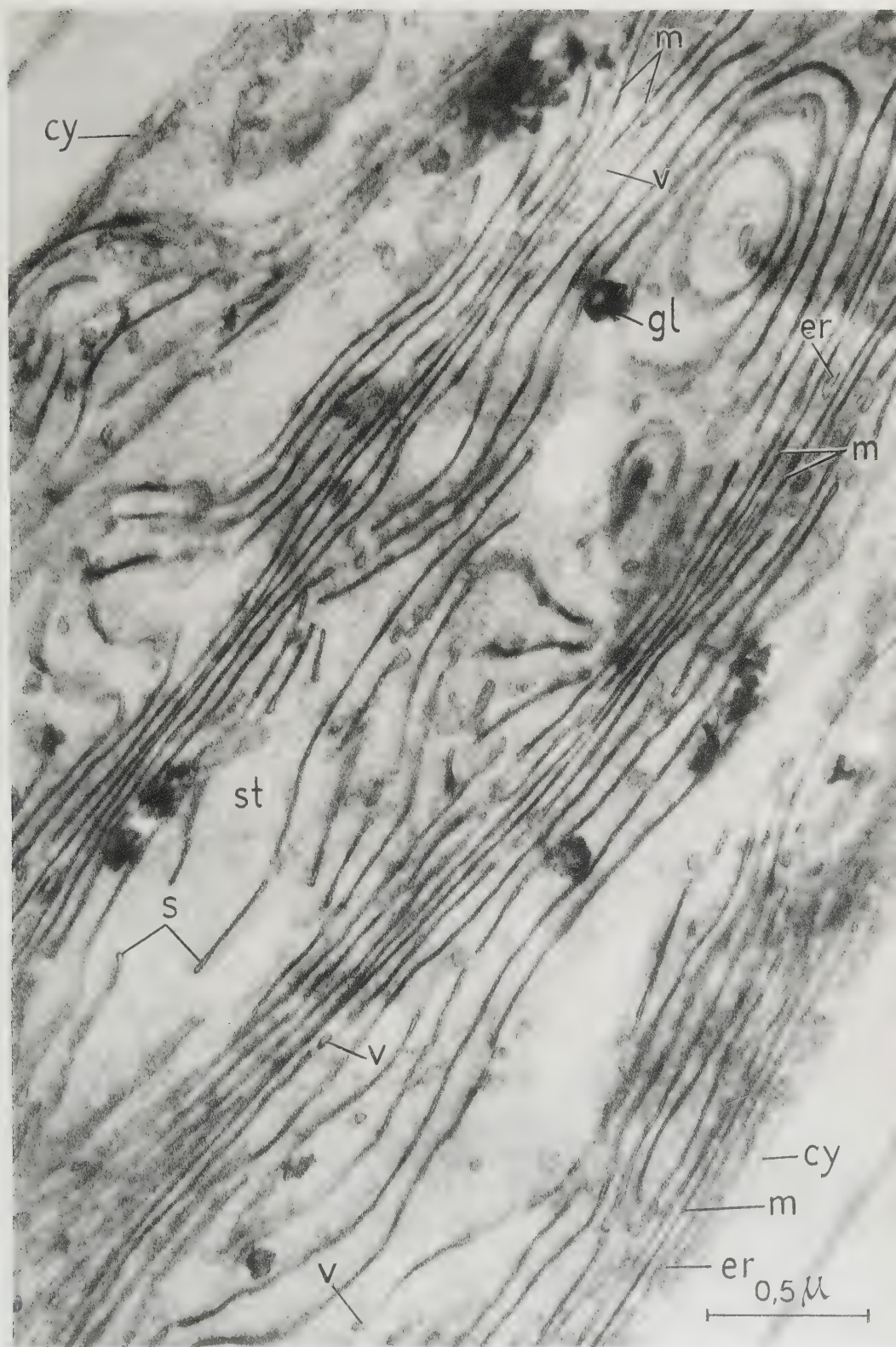
Cette étude sur les spectres d'absorption est confirmée par l'étude des spectres de fluorescence de *Stichochrysis*.

## B. — LA FLUORESCENCE DES PIGMENTS DE *RHODOSORUS* ET DE *STICHOCHRYISIS*

Les mesures de fluorescence sur les algues *in vivo* font apparaître l'existence d'un pic de fluorescence vers  $720\text{ m}\mu$ . Ce pic, peu important chez *Rhodosorus* et les diverses algues rouges étudiées (fig. 7) est, par contre, très visible chez *Stichochrysis* où l'in-

### PLANCHE IV

Portion de cellule de *Batrachospermum* sp. montrant trois plastides accolés ; on observe des extrémités de saccules *s* et de nombreuses vésicules *v* dans le prolongement de ceux-ci, ce qui suggère soit un morcellement soit au contraire la formation de saccules par accolement des vésicules ; membrane des plastides *m*, membrane cytoplasmique *cy*, globules lipidiques *gl*, stroma de densité électronique variable *st*, ergastoplasme *er*, longeant souvent les parois du plaste. Fixation au permanganate de potassium.  $\times 50\,000$ .





tensité de la fluorescence à 717 m $\mu$  dépasse celle de la chlorophylle *a* que l'on trouve habituellement à 685 m $\mu$  (fig. 8). La fluorescence de la chlorophylle *a* ne forme plus qu'un épaulement sur le spectre. On peut caractériser la courbe par le rapport de fluorescence  $f = \frac{F_{717 \text{ m}\mu}}{F_{685 \text{ m}\mu}}$ . Ce rapport est égal à 0,3 pour un spectre de Chlorelles et il peut atteindre ici 7. La réabsorption cellulaire persiste évidemment et peut contribuer à élever ce rapport.

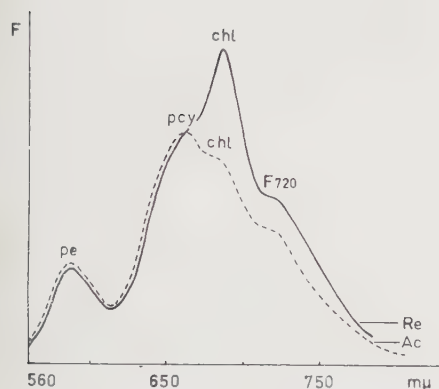


FIG. 7. — Spectres de fluorescence de *Rhodospirillum rubrum* (lumière excitatrice à 525 m $\mu$ ).

- Re : spectre des algues *au repos*  
 Ac : spectre des algues en culture *accélérée*  
 les deux spectres étant pris dans la phase stationnaire de la fluorescence.  
 Pe : phycoérythrine ; pcy : phycocyanine ;  
 chl : chlorophylle, F 720 : fluorescence à 720 m $\mu$ .

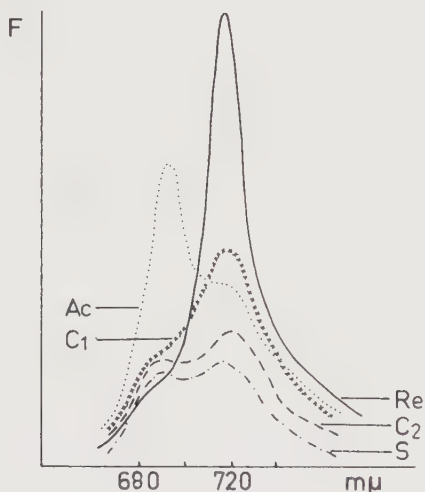


FIG. 8. — Modifications du spectre de fluorescence au cours de l'extraction des plastides.

- Re : spectre des algues *au repos* utilisées dans cette expérience.  
 C<sub>1</sub> : spectre du culot de centrifugation à 200 G (15 mn). Il reste de nombreuses cellules entières.  
 C<sub>2</sub> : spectre des plastides sédimentés après 20 mn à 1 000 G.  
 S : spectre du surnageant ; Ac : spectre des algues en culture *accélérée*.

## 1. Étude de la fluorescence à 717 et 720 m $\mu$

### a — *Stichochrysis*

L'existence de la variation du pic 717 m $\mu$  dépend de l'état des cultures. La distinction déjà faite pour les spectres d'absorption entre cultures *accélérées* et algues *au repos* est encore nette. Les premières ont un spectre de fluorescence caractérisé par une valeur faible du rapport  $f$  ( $f = 0,4$ ) ; par contre, les secondes ont un pic de fluorescence d'importance croissante avec l'âge de la culture et qui, au bout d'un mois, masque presque entièrement le pic 685 m $\mu$  ;  $f$  est alors plus élevé ( $f = 7$ ) (fig. 8 Re).

L'examen des variations de la fluorescence en fonction de divers facteurs a été fait comme pour les spectres d'absorption.

Un chauffage de 5 mn à 50 °C ne modifie pas la forme du spectre. La fragmentation des plastes par la méthode des ultrasons montre les modifications présentes dans la figure 8 (C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, S). La fluorescence émise à 717 mμ, qu'on appellera F 717, est très diminuée par rapport à la fluorescence 685 mμ.

Les culots de centrifugation à 200 G et 1 000 G ont une F 717 encore supérieure à F 685 (fig. 8, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>), mais la différence s'amenuise et le surnageant a pratiquement un spectre à deux sommets d'égale hauteur (fig. 8, S). Le tableau II indique les valeurs correspondantes du rapport *f*.

TABLEAU II

| Fluorescence de <i>Stichochrysis</i> , variation du rapport $f = \frac{F\ 717}{F\ 685}$ |                 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| (longueur d'onde excitatrice 600 mμ)                                                    |                 |
| algues témoins — cultures accélérées                                                    | <i>f</i> = 0,65 |
| algues âgées de deux mois (au repos)                                                    | <i>f</i> = 9    |
| culot à 200 G                                                                           | <i>f</i> = 2,4  |
| culot à 1 000 G                                                                         | <i>f</i> = 1,4  |
| surnageant                                                                              | <i>f</i> = 1    |

Ces résultats sont légèrement variables d'une expérience à l'autre.

La disparition de la fluorescence à 717 mμ se produit parallèlement à la disparition de C<sub>a</sub> 695, P<sub>a</sub> 705. Les deux faits peuvent être reliés car un pigment absorbant vers 705 mμ peut avoir une bande de fluorescence décalée vers les grandes longueurs d'onde de 10 à 15 mμ, soit vers 715-720 mμ, ce qui est bien le cas ici.

#### b — *Rhodorus*

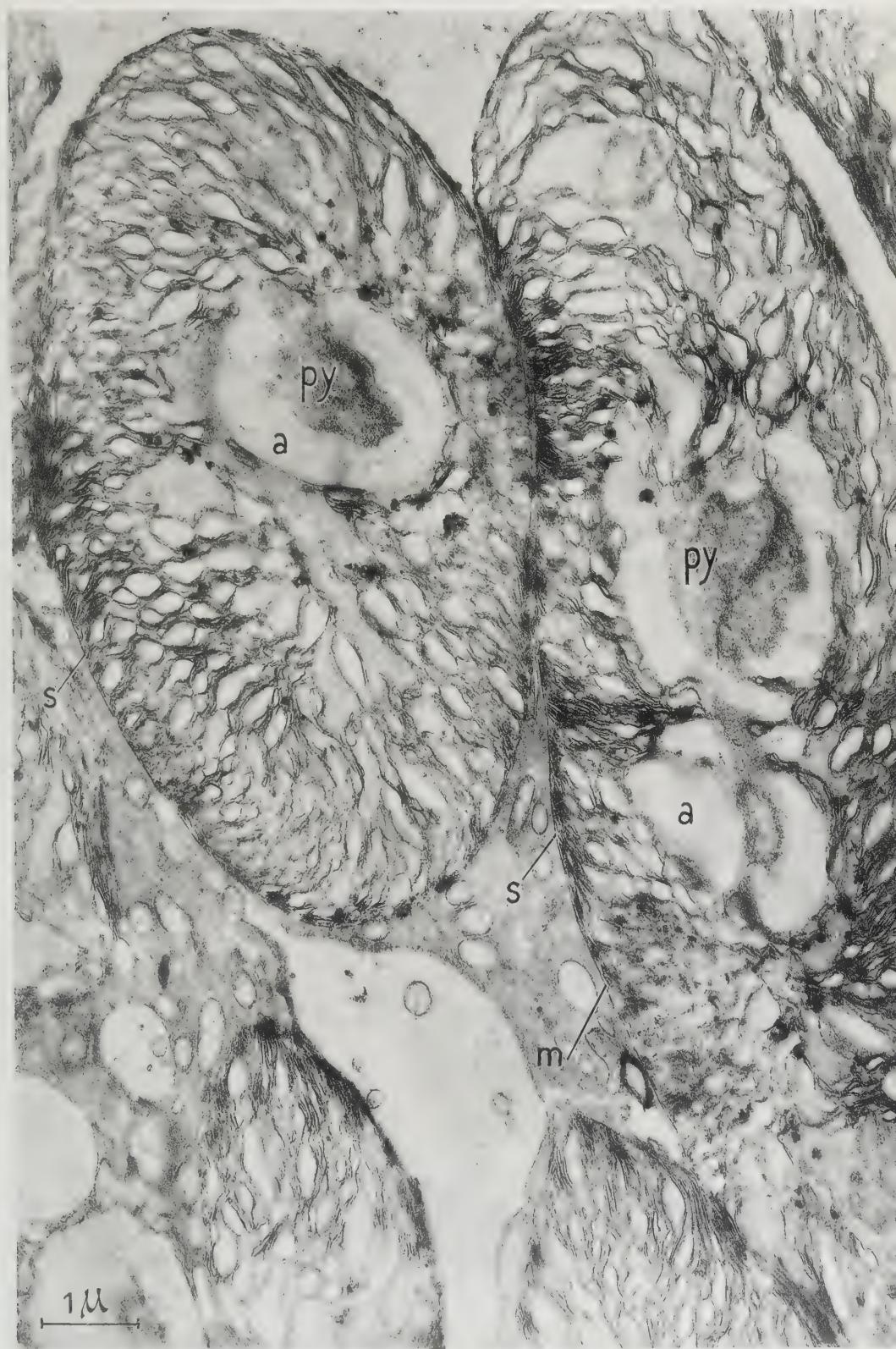
A côté du pic de fluorescence à 685 mμ, qui est beaucoup plus aigu, on constate une bosse à 720 mμ (fig. 7), (en abrégé F 720), l'importance du pic de la chlorophylle à 685 mμ et l'intervention à 720 mμ de la fluorescence de la phycocyanine font que le sommet de la bosse est repoussé de quelques mμ vers les grandes longueurs d'onde (fig. 7). Ce sommet correspond au pic 717 de *Stichochrysis*.

L'analyse de F 720 est difficile. L'excitation directe en lumière bleue (440 mμ), où seule la chlorophylle *a* absorbe, permet de préciser la participation de celle-ci. La hauteur de la bosse est alors voisine du pic à 685 mμ, mais souvent inférieure. C'est ce que DUYSSENS (1951) a constaté aussi avec *Oscillatoria*. F 720 se retrouve chez d'autres Rhodophycées et Cyanophycées étudiées (MOYSE et GUYON, 1963).

L'analyse de ce pic supplémentaire est rendue difficile par la présence des phycobilines qui ont tendance à passer en solution et qui masquent alors, par leur propre accroissement de fluorescence, celle due aux autres pigments.

#### PLANCHE V

Plastes de *Bryopsis plumosa*. Les saccules ont, comme dans le genre *Codium* (fig. 16), une extrémité s le long de la membrane du plaste et sont souvent disposés radialement ; *py*, pyrénolide ; *a*, amidon ; *m*, membrane du plaste. Fixation au permanganate de potassium. × 14 000.





La bande d'absorption dans le rouge de *Rhodorus marinus* (fig. 3, chl) ne présente pas de  $C_a$  695,  $P_a$  705 visible ; il est donc difficile de préciser les rapports entre le pigment et sa fluorescence comme dans le cas de *Stichochrysis*. Il ne semble pas que l'âge des cultures modifie beaucoup l'allure du spectre. Les variations, si elles existent, sont de faible amplitude.

## 2. Modifications de la fluorescence aux basses températures

Comme pour les Chlorelles (BRODY, 1958), la fluorescence F 717 augmente quand la température s'abaisse ; elle devient toujours très importante à  $-190$  °C. Ce résultat se retrouve pour *Rhodorus* et *Stichochrysis* (fig. 9 b et 9 c) et aussi pour les chloroplastes isolés de Maïs. Chez *Stichochrysis*, la courbe à  $-190$  °C, obtenue à partir d'algues en culture accélérée, est semblable à celle des algues *au repos* à la température ordinaire. L'évolution du phénomène a été étudiée avec *Rhodorus*, plus particulièrement au début du refroidissement et jusqu'à  $-20$  °C (voir fig. 9 a). Les mesures ont été faites à travers un DEWAR transparent, la suspension d'algues étant refroidie par un courant d'air desséché barbotant dans l'azote liquide.

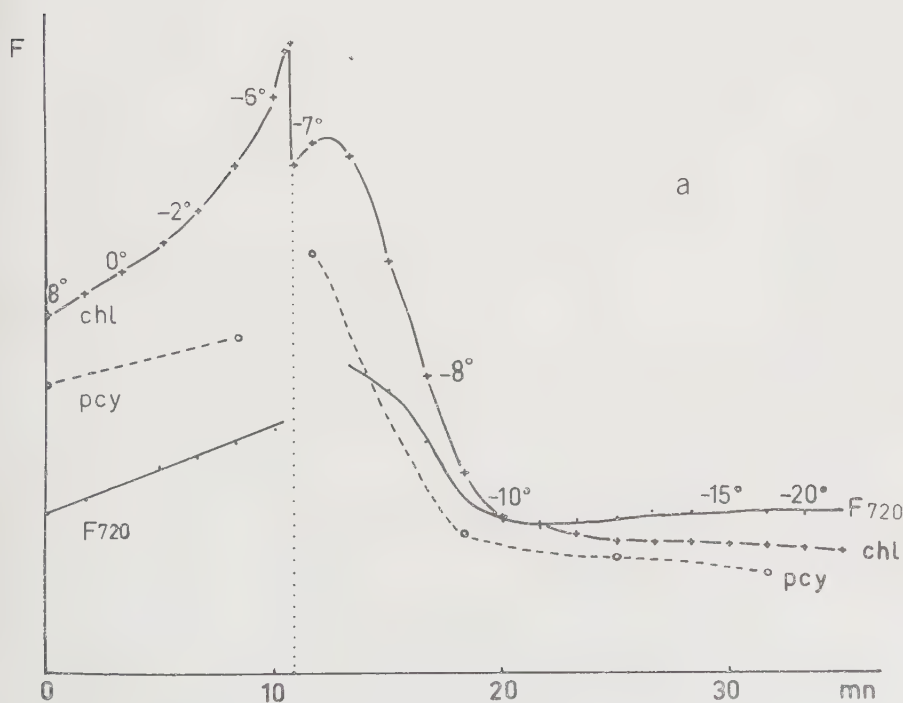


FIG. 9 a. — Evolution de la fluorescence lors du refroidissement d'une suspension de *Rhodorus*.

Au-dessous de  $-10$  °C, la fluorescence du pigment F 720 croît, alors que celles de la phycocyanine, pcy, et de la chlorophylle, chl, décroissent.

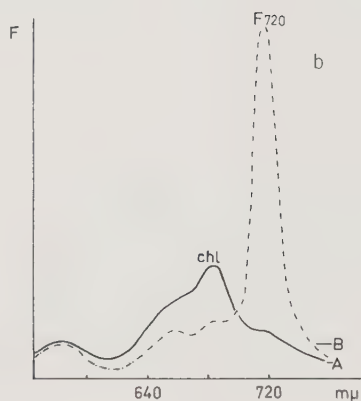


FIG. 9 b. — Spectre de fluorescence de *Rhodospirillum rubrum* à basse température.

A : spectre à  $+2^{\circ}\text{C}$  ; B, spectre à  $-190^{\circ}\text{C}$  environ. On constate la très grande augmentation de la fluorescence à  $720\text{ m}\mu$ , F 720.

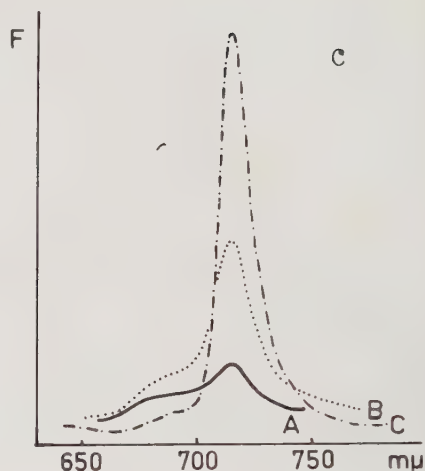


FIG. 9 c. — Spectre de fluorescence de *Stichochrysis salina* à basse température.

A : spectre témoin à  $+20^{\circ}\text{C}$  ; B, spectre de fluorescence à  $-100^{\circ}\text{C}$  ; C : spectre de fluorescence à  $-190^{\circ}\text{C}$ .

La fluorescence augmente avant la solidification qui s'effectue vers  $-6^{\circ}\text{C}$ , puis les fluorescences de la chlorophylle et de la phycocyanine décroissent tandis que le pic  $717\text{ m}\mu$  croît lentement. La variation de fluorescence est très forte entre  $-100^{\circ}\text{C}$  et  $-190^{\circ}\text{C}$ , donc difficilement interprétable par une réaction chimique. Il s'agit plutôt d'une désactivation thermique. L'énergie qui n'est plus dissipée sous forme de chaleur augmente la fluorescence F 717 dont la courbe d'absorption est la plus éloignée vers les grandes longueurs d'onde.

### 3. Spectres en écoulement intermittent

Les spectres obtenus par écoulement intermittent selon la méthode de LAVOREL (1962) mettent en évidence les deux parties du complexe chlorophyllien, le premier à rendement de fluorescence constant et le deuxième à rendement variable. Les deux émissions ont à peu près la même importance, comme on le remarque sur la figure 10

## PLANCHE VI

Vue partielle de chloroplaste isolé de Maïs : on observe les granums *gr* et les lamelles générales *l*, les interruptions de ces lamelles *p* qui correspondent aux perforations visibles en coloration négative (voir planche X). On en trouve même dans les granums *p'*. Un granum est formé par l'alternance de disques granaires *d* et de lamelles générales dont certaines se terminent au bord du granum. Fixation au permanganate de potassium.  $\times 100\,000$ .





*a* et *b*. Le spectre de différence entre les maximums et les minimums du spectre en écoulement intermittent a bien la même allure que les précédents. La distinction entre les algues en culture *accélérée* et *au repos* est la même. Le spectre de la partie variable a donc aussi un sommet principal à 717 m $\mu$  pour les algues *au repos*. Il peut être dû au transfert de l'énergie à partir de la chlorophylle *a* à 685 m $\mu$ , dont les variations de fluorescence se répercuteraient sur le pigment absorbant vers les grandes longueurs d'onde. Pour le *Rhodorus*, le spectre montre que les phénomènes d'induction de la fluorescence n'existent qu'au niveau de la chlorophylle.

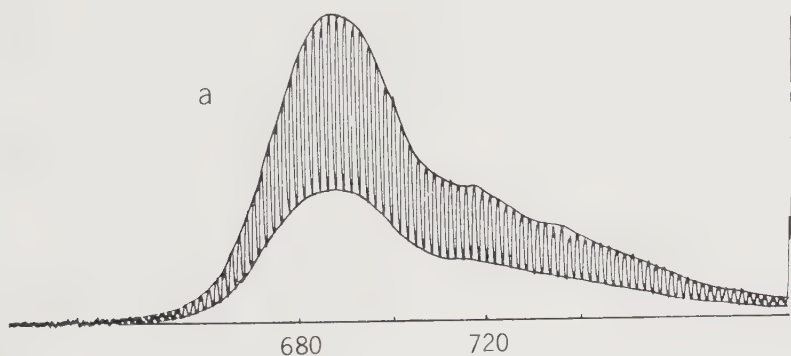


FIG. 10 a. — Spectre de fluorescence de *Stichochrysis* en écoulement intermittent pour des algues en culture *accélérée*.

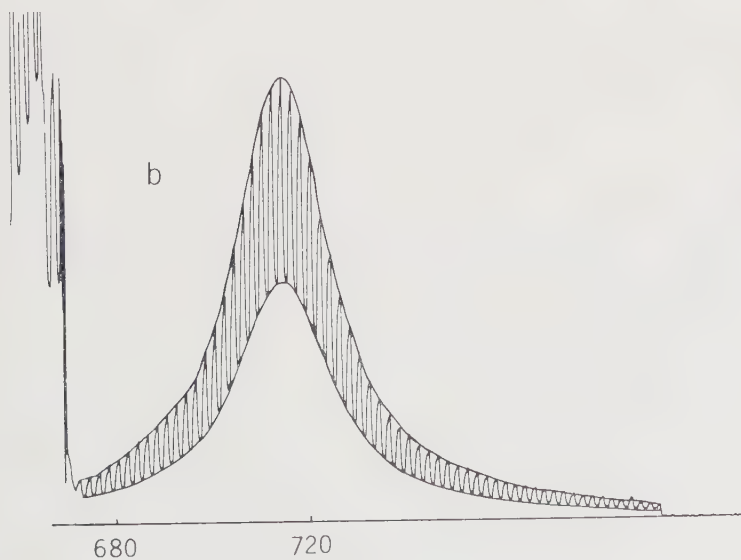


FIG. 10 b. — Spectre de fluorescence de *Stichochrysis* en écoulement intermittent pour des algues *au repos*.

En *a* comme en *b* les spectres de la partie constante (zone comprise entre l'axe des abscisses et la courbe inférieure) et de la partie variable (zone comprise entre les deux courbes) sont identiques pour un même type d'algue. (ordonnées : fluorescence en valeur relative ; abscisses :  $\lambda$  en m $\mu$ ).

Cet ensemble de faits tend à montrer que la fluorescence à  $717\text{ m}\mu$  est liée à l'existence d'une chlorophylle *a* absorbant vers  $700\text{ m}\mu$ . Ce pigment s'observe chez divers végétaux, il est plus facilement décelable par sa fluorescence que par son absorption.

### C. — LES MODIFICATIONS DES SPECTRES DE FLUORESCENCE DES RHODOPHYCÉES.

Chez les Rhodophycées, les transferts d'énergie entre les phycobilines et la chlorophylle sont susceptibles de variations assez importantes qui résultent soit du mode de culture soit de traitements physiques ou chimiques. Les spectres sont étudiés après a phase d'induction de fluorescence, dans la phase stationnaire.

Il est possible de faire encore ici la distinction entre cultures *accélérées* et cultures *au repos*. Les spectres des algues *au repos* (fig. 7) ont un pic de fluorescence de la chlorophylle beaucoup plus élevé que celui obtenu avec les algues en cultures *accélérées*. Cet accroissement de la fluorescence n'est pas dû à une augmentation de la quantité de chlorophylle chez les algues *au repos*. Celles-ci ont en effet la même teneur en chlorophylle que les autres algues, mais elles sont plus riches en phycobilines. Il y a donc amélioration du transfert entre les phycobilines et la chlorophylle pour les algues *au repos*.

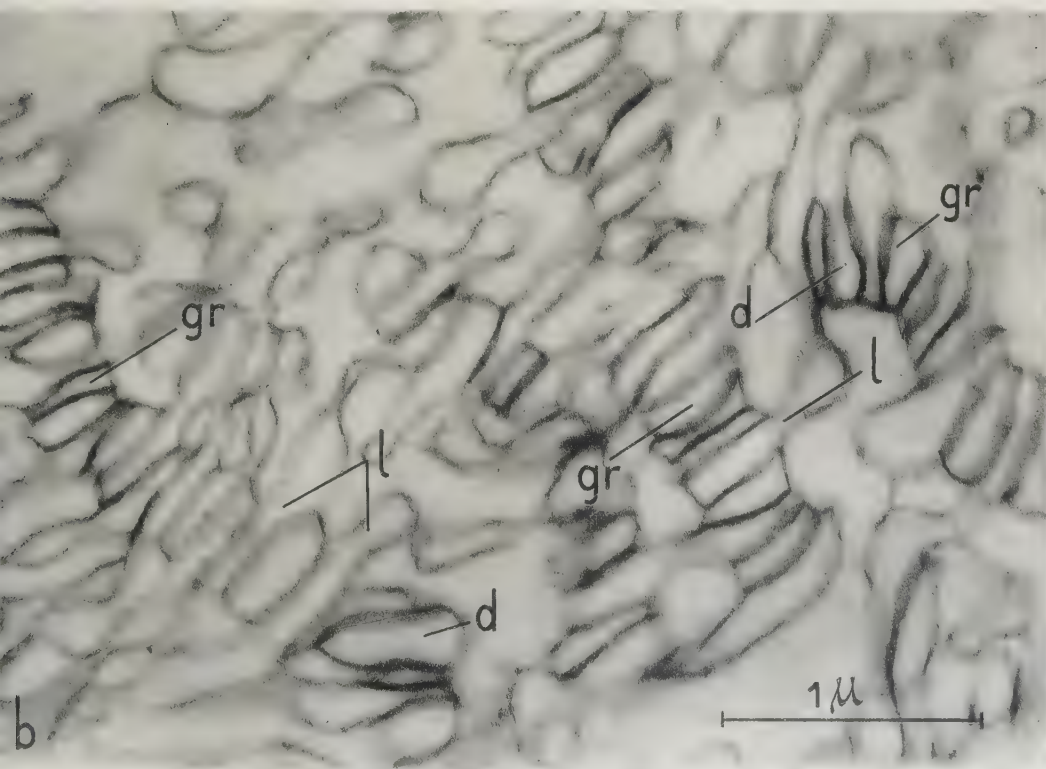
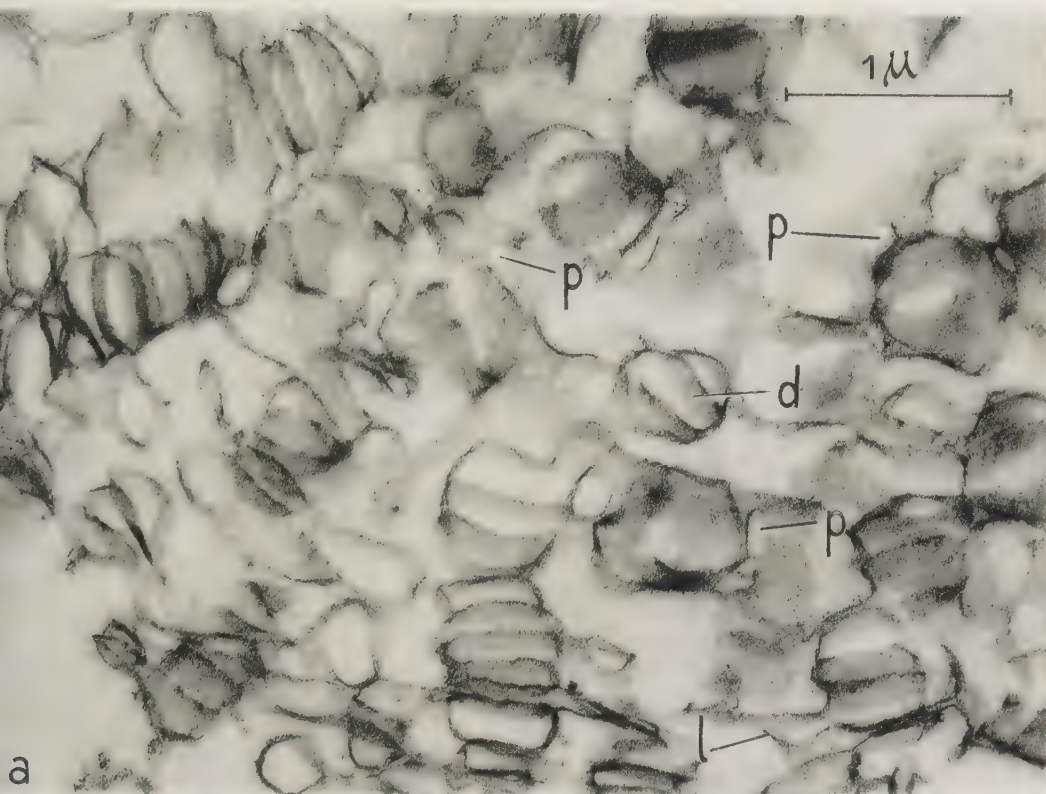
Ces modifications de fluorescence peuvent être dues à des variations de distance entre les molécules des deux catégories de pigments. Le contrôle cytologique montre que les algues en culture *accélérée* ont un contenu cellulaire moins bien ordonné que les algues *au repos* et notamment un plaste dont les lamelles sont disposées moins régulièrement. Le pyrénoïde est souvent en partie résorbé dans la masse du plaste. Il est possible que les modifications cytologiques aient un retentissement sur l'arrangement des molécules de pigment.

Les expériences destinées à vérifier cette hypothèse aboutissent le plus souvent à constater un découplage entre les phycobilines et la chlorophylle, ce qui se traduit par une disparition de la fluorescence de cette dernière, induite par les phycobilines (excitation à  $540\text{ m}\mu$ ). Un traitement thermique de cinq minutes à  $55^\circ\text{C}$  donne ce résultat. Il en est de même des algues soumises à des chocs obtenus par agitation vigoureuse dans un broyeur rotatif à grande vitesse, les cellules elles-mêmes n'étant cependant pas détruites.

L'addition de quinone et de formol fait augmenter la fluorescence des phycobilines et disparaître celle de la chlorophylle. Un autre procédé très sensible, consiste à faire varier la pression osmotique du milieu. Les algues sont altérées rapidement dans l'eau distillée ou dans un milieu hypotonique ( $\text{NaCl } 10\text{ g/l}$ ), les phycobilines diffusent alors dans la vacuole. Un traitement plus modéré, par exemple dans un milieu légèrement dilué ( $24\text{ g/l}$  de  $\text{NaCl}$ ) produit une diminution du transfert entre phycobilines et chlorophylle. La chlorophylle des algues remises dans le milieu de

### PLANCHE VII

- a. Chloroplaste isolé de Maïs gonflé par passage dans l'eau distillée. Les unités membranaires des disques granaires *d* et des lamelles *l* sont écartées ; on voit des portions de lamelles à plat avec des perforations *p*. Fixation au permanganate de potassium.  $\times 30\ 000$ .
- b. Autre portion de chloroplaste gonflé montrant la composition des granums.  $\times 35\ 000$ .





culture émet une fluorescence dont l'intensité est plus grande que précédemment mais elle n'atteint pas le niveau de départ. Il était intéressant de voir si un effet du même type pourrait se produire dans des algues placées en milieu hypertonique.

Sur des cellules laissées pendant dix minutes dans une solution de KCl 2 *M*, on observe une augmentation très notable du pic de fluorescence de la chlorophylle (fig. 11). On constate en même temps, que le phénomène d'induction de fluorescence, lors de l'illumination à 540 *mμ* ne se produit plus. D'ailleurs, à cette concentration saline, la photosynthèse est inhibée. Les mesures du dégagement d'oxygène photosynthétique montrent qu'à une concentration de 60 g/l la vitesse de la photosynthèse n'est pas modifiée, mais à la concentration saline 3/2 *M* (87 g/l), elle est déjà presque nulle.

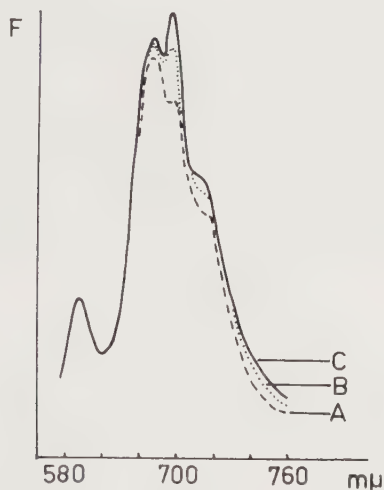


FIG. 11. — Modifications du spectre de fluorescence de *Rhodospirillum rubrum* en fonction de la pression osmotique et du milieu.

A : milieu de culture, B : milieu hypertonique NaCl 2*M*,

C : milieu hypertonique NaCl 4*M*. On pourrait obtenir l'évolution de C vers A par passage du milieu de culture à un milieu hypotonique.

Dans ces conditions, l'augmentation de la fluorescence dans la solution de KCl 2*M* peut être due à une autre voie d'utilisation de l'énergie lumineuse. Si on met à nouveau les algues dans une solution 4*M*, l'augmentation du pic de fluorescence de la chlorophylle est encore aussi nette que précédemment. *Dans ce cas, cette variation ne peut plus être attribuée à l'arrêt de la photosynthèse, mais doit plutôt provenir d'une modification de l'état du plaste qui se contracte comme la cellule entière.* Il y aurait donc une modification de la répartition spatiale des molécules de biliprotéines par rapport à la chlorophylle. Les molécules des pigments se rapprocheraient les unes des autres

On peut léser partiellement les cellules en les chauffant pendant 5 mn à 40 °C. Le phénomène se produit encore, alors que les algues sont incapables de photosynthèse.

Ces effets seront confirmés par l'étude des modifications cytologiques du *Rhodospirillum rubrum*, au moyen du microscope électronique.

## ÉTUDE DES INFRASTRUCTURES DE L'APPAREIL PHOTOSYNTHÉTIQUE DES ALGUES

### A. — ÉTUDE DES COUPES DE PLASTES EN MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

Les plastes sont constitués d'une substance fondamentale, le stroma, traversée par des systèmes lamellaires analogues aux membranes plasmiques du cytoplasme. Ils sont limités par une double membrane identique à ces dernières.

On trouve souvent chez les Algues un pyrénoïde en relation avec les lamelles. Son rôle n'est pas connu, il peut être en rapport avec l'accumulation de réserves, notamment l'amidon. Les plastes des Algues ont des tailles variées. Ils sont fusiformes chez *Vaucheria* et mesurent environ  $3,5\ \mu$  de long sur  $2\ \mu$  de large (fig. 12). Ceux de *Stichochrysis*, de  $4\ \mu$  sur  $2\ \mu$ , occupent presque la moitié du volume cellulaire. Les plastes des Rhodophycées sont souvent arrondis, lobés ou encore en fuseau comme chez *Rhodomela subfusca* ( $4\ \mu \times 1,5\ \mu$ ) (Planche III, b). Les plastes de *Batrachospermum* sont longs et étroits ( $7\ \mu \times 1\ \mu$ ) (fig. 14). Ceux de *Rhodosorus* sont pariétaux, en forme de cloche dont les bords profondément échancrés en quatre points constituent des digitations (fig. 15).

L'étude cytologique sera faite dans l'ordre systématique des différents embranchements.

#### 1. *Vaucheria* (Xanthophycée)

Le plaste est parcouru sur toute sa longueur par des faisceaux de lamelles, groupées en trois paires dans la plus grande partie de leur surface. L'unité fondamentale est formée de deux lamelles qui constituent des enclaves aplaties appelées saccules. On observe par endroit sur la figure 12, les extrémités arrondies de ces formations. En général, les saccules s'étendent sur toute la longueur du plaste. Un faisceau est donc formé par l'empilement de trois feuilletts doubles. Ça et là un seul des trois saccules semble se terminer, un autre débutant un peu plus loin ; il s'agit vraisemblablement d'un trou qui, observé en coupe, apparaît comme une interruption. On constate un cas semblable pour les chloroplastes de Maïs (Planches VIII et X). On peut trouver aussi des plastes où dans chaque faisceau une lamelle se sépare des deux autres et se joint à celle d'un faisceau voisin (fig. 12).

La membrane du plaste est composée de deux couches, sa structure est identique à celle des saccules. Chaque lamelle élémentaire observée à un fort grossissement est formée de deux zones denses, séparées par une zone claire elle constitue donc un ensemble comparable à l'unité membranaire de ROBERTSON (1959) décrite dans les couches myéliniques de la gaine de SCHWANN. Cette unité compose toute membrane plasmique lipoprotéique.

Chez la *Vaucheria*, l'ensemble d'une lamelle élémentaire mesure entre 55 et 70 Å. Chaque saccule comprend deux unités membranaires et une zone claire cen-

### PLANCHE VIII

- a. Vue d'ensemble d'un gros fragment de chloroplaste de Maïs en *coloration négative*. Les nombreux empilements granaires *gr* sont bien visibles ; entre eux on distingue les lamelles générales avec leurs perforations *p*. Sans fixation.  $\times 14\ 000$ .
- b. Vue détaillée des granums *gr*, dont on aperçoit la structure granulaire.  $\times 80\ 000$ .

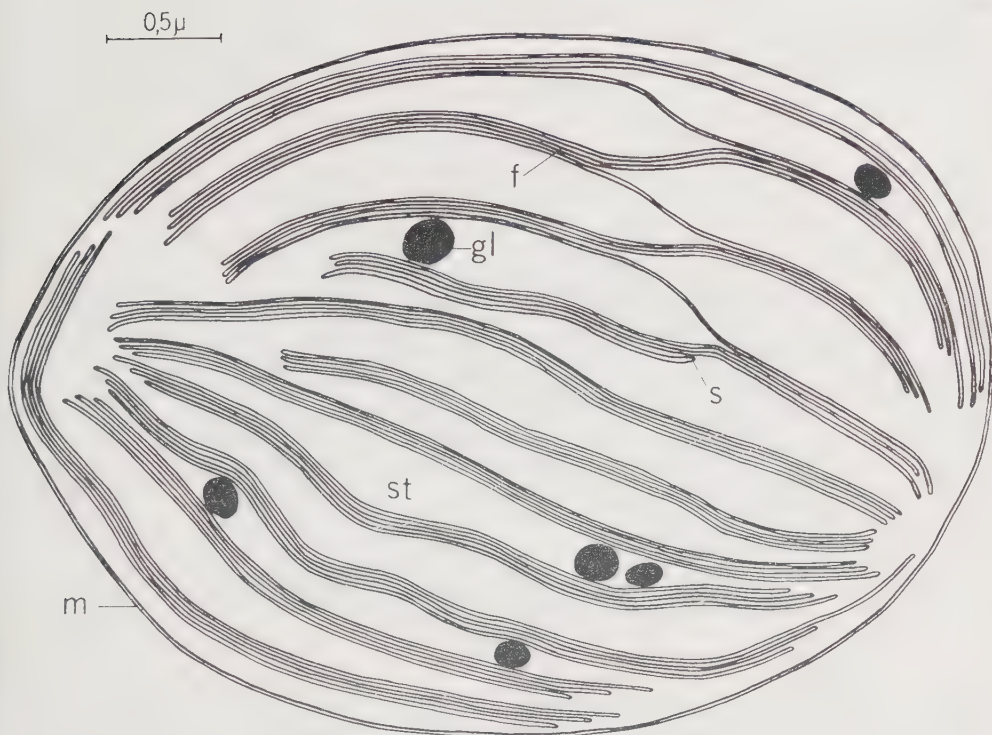


FIG. 12. — Plaste de *Vaucheria*. — Schéma montrant la disposition des saccules par faisceaux de 3 (*f*) ; *s*, extrémité d'un saccule ; *m*, membrane du plaste ; *st*, stroma ; *gl*, globule lipidique.

trale capable, peut-être selon la fixation, de varier localement d'épaisseur (deux à trois fois). (Planche I, *a*).

Dans les régions où les lamelles sont bien parallèles, le saccule est épais de 160 Å, ce qui laisse pour la partie centrale 20 à 50 Å.

Le stroma est homogène, il contient quelques grains lipidiques osmiphiles, d'un dixième de micron de diamètre en moyenne, que la fixation osmique conserve mieux que celle au permanganate. Par contre le premier fixateur semble beaucoup moins bon pour l'analyse des associations de saccules ; des lamelles voisines de deux saccules différents se confondent souvent. Par fixation osmique, on observe des faisceaux de quatre couches, deux externes minces, deux internes épaisses. Dans certains cas favorables, on constate que les couches épaisses se divisent localement en deux couches minces, on obtient alors les trois saccules bien visibles, comme après fixation au permanganate (cf. GIRAUD, 1962).

Cette structure se retrouve chez les Phéophycées. Elle a été observée chez *Pylaiella* (GIRAUD, 1962) et chez de nombreuses Fucales et Laminariales (BERKALOFF, 1961, 1963).

## 2. *Stichochrysis* (Chrysophycée)

Dans le plaste de *Stichochrysis* (fig. 13), se trouvent aussi des faisceaux de six lamelles mais elles sont très minces. Alors que chez *Ochromonas* l'épaisseur des saccules est de 160 Å, elle n'atteint ici que 75 à 80 Å, soit environ la moitié (Planche

I, b). Les extrémités des saccules sont fines et rarement visibles (Planche II, b). Les zones denses et claires alternent régulièrement et sont d'une épaisseur à peu près équivalente. L'épaisseur de chaque couche dense doit être d'environ 25 à 30 Å, ainsi que celle de la couche claire qui les sépare. Les espaces entre les deux lamelles doubles sont également peu épais. On compte environ 100 à 120 lamelles dans un plaste. Le stroma est très peu important dans les algues *au repos*. Il est beaucoup plus abondant dans les algues en culture *accélérée*, de ce fait les faisceaux de lamelles sont plus espacés.

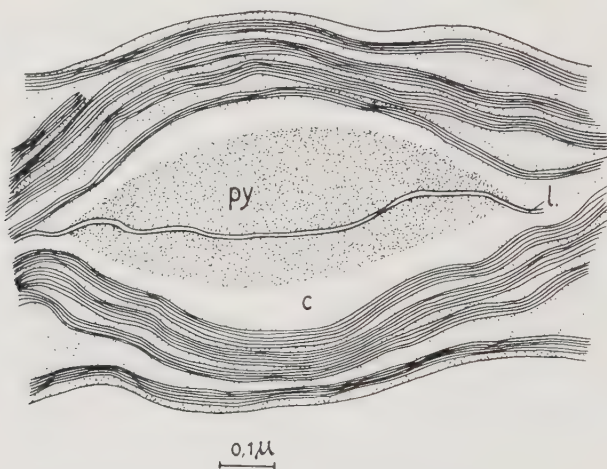


FIG. 13. — Portion de plaste de *Stichoehrysis* montrant le pyrénome, *py*, à l'intérieur des groupes de six lamelles. Il est traversé par une lamelle double *l*, et limité par une zone claire, *c*, de constitution inconnue. (Extrait du *Journal de Microscopie* GIRAUD, 1962).

Au centre, les lamelles s'écartent et limitent un espace fusiforme occupé par le pyrénome. Ce dernier est constitué d'une zone centrale *py*, dense, traversée par une lamelle double (fig. 13 et Planche II a). Celle-ci peut se modifier à ses extrémités et donner en se réduisant un tube qui est visible sur des coupes tangentielles du plaste. Autour de la partie centrale *py*, on observe une zone claire *c* ayant vraisemblablement la forme de deux cupules séparées par le plan lamellaire *l*. Aucune indication, même en microscopie photonique n'a pu être obtenue pour caractériser sa composition. L'épaisseur de cette zone claire est variable.

Les trois constituants : zone dense, lamelle qui la traverse et zone claire périphérique, se trouvent de façon constante dans le pyrénome typique de cette algue ; il semble donc que cette zone claire soit due réellement à une différenciation du stroma.

Il n'y a pas d'amidon chez *Stichoehrysis*. Les seules inclusions de réserve connues de cette algue sont des globules lipidiques et de la leucosine qui se trouve à l'intérieur du cytoplasme.

L'existence de ces lamelles très fines et très serrées constitue l'élément nouveau et important qu'apporte l'étude de *Stichoehrysis*. La *coloration négative* le confirmera.

### 3. Rhodophycées

Les plastides des Rhodophycées sont caractérisés par l'isolement de chaque saccule dans un stroma plus abondant que chez les autres Algues. Les lamelles doubles

sont équidistantes les unes des autres et s'étendent sur toute la longueur du plastide. La plus externe longe la membrane plastidale et entoure les autres (fig. 14). Chez *Rhodorus*, il y a huit lamelles doubles, et chez *Batrachospermum* on en trouve douze environ (fig. 14, Planche III a et Planche IV).

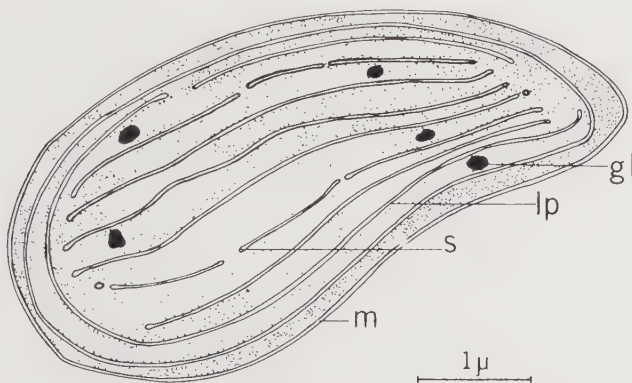


FIG. 14. — Plastide de *Batrachospermum* sp., Ce plastide représente assez bien le type du plastide des Rhodophycées, *lp* : lamelle double. La plus externe entoure les autres et double la membrane, *m* du plastide. Les lamelles sont parfois morcelées, elles se terminent par des vésicules renflées *s* ; *gl*, globule lipidique.

Les lamelles ne sont pas toujours des feuillet plans, elles peuvent se courber sur elles-mêmes et former des portions de cylindre. Les bords des saccules sont renflés en ampoules. Chez *Batrachospermum*, on observe des régions où deux groupes de lamelles s'affrontent par ces terminaisons renflées. Ces images suggèrent l'existence d'une constriction transversale de quelques saccules. Des vésicules arrondies (*v*, Planche IV) sont parfois disposées dans le prolongement de ces saccules. La membrane du plastide, comme chez *Vaucheria*, a une structure identique à celle des lamelles doubles.

Les fixations osmiques et permanganiques donnent des résultats légèrement différents. Le tétraoxyde d'osmium permet de voir deux zones denses externes et une zone centrale claire d'épaisseur variable parfois artificiellement gonflée (4 à 5 fois son épaisseur normale). La fixation au permanganate conserve un aspect uniforme aux lamelles, mais parfois provoque la formation de couches triples dues à l'accolement des deux bords internes des lamelles. Le phénomène est dû à une contraction de la partie centrale du saccule. Cette région semble donc de consistance très inégale, capable de subir des variations de volume très grandes. Sa nature, peut-être protéique, est inconnue.

Les unités membranaires sont également observables dans les lamelles de *Rhodomela*. L'épaisseur des différentes parties a pu être mesurée. Chaque unité membranaire a 60 Å d'épaisseur, les couches denses ayant environ 20 à 25 Å. Le saccule est alors épais de 160 Å, de même que chez *Rhodorus* et *Batrachospermum*. Le stroma est homogène sauf dans quelques aires éloignées des lamelles où il devient perméable aux électrons. On peut se demander s'il ne s'y trouverait pas une substance de réserve. Il ne peut s'agir de l'amidon floridéen qui se forme toujours en dehors du plastide. Il n'a aucune structure mais le pourtour des grains d'amidon est ombré. Il est possi-

ble que les zones plus claires correspondent à des points d'accumulation de composés solubles non fixés par les méthodes classiques et qui sont éliminés dans les bains de lavage ou les opérations d'imprégnation.

Les Bangiales et quelques Nemalionales (Floridées) sont les seules Rhodophycées à posséder des pyrénoides. Ceux-ci se trouvent au centre du plaste chez *Porphyra* et chez *Porphyridium* et sont formés d'une substance homogène comparable au stroma. Dans les deux genres, ils sont parcourus par quelques lamelles doubles qui suivent un parcours très sinueux chez *Porphyridium* (GIRAUD, 1962).

Les pyrénoides sont bordés par des grains osmiophiles. De nombreuses lamelles s'arrêtent à ce niveau. Sur *Porphyra*, on n'observe aucune structure correspondant aux stries transversales décrites par FELDMANN et SCHOTTER (1949) en microscopie photonique. Ces stries apparaissent après coloration à la solution iodo-iodurée sur *Porphyra umbilicalis* et *Rhodothamniella caespitosa*. L'impossibilité de faire des réactions sur coupe avec ce réactif, au microscope électronique, ne permet pas de contrôler ce résultat. Il est possible que la solution iodo-iodurée gonfle les lamelles ou rétracte la substance du pyrénoidé et fasse apparaître des stries. Dans ce cas, il est étonnant que d'autres substances ne provoquent pas le même effet.

Parmi les Bangiales, le *Rhodosorus* est un exemple unique d'Algue dont le plaste a un pyrénoidé en saillie. Sa structure est aussi tout à fait particulière (fig. 15).

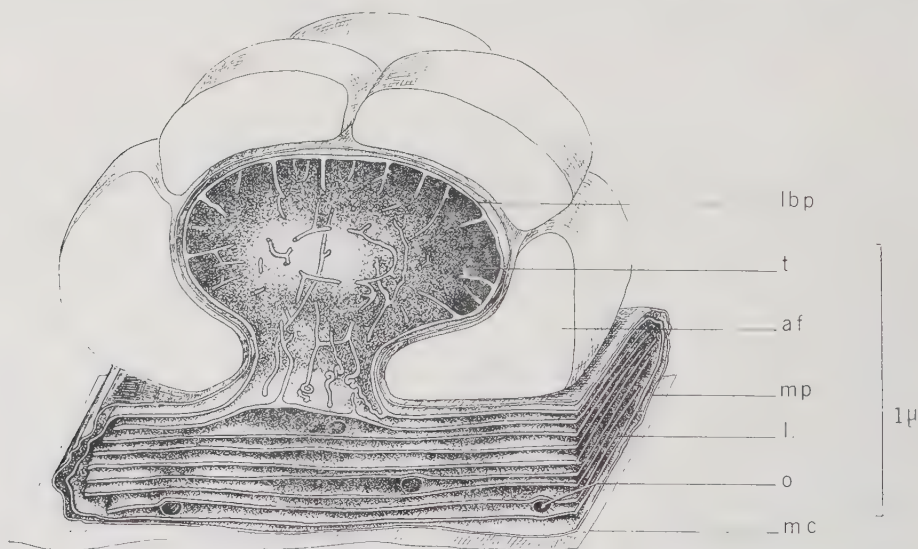


FIG. 15. Pyrénoidé de *Rhodosorus marinus*. La lamelle périphérique du plaste *lbp*, borde aussi le pyrénoidé. Des tubes *t* en partent et forment un réseau complexe. *af*, amidon floridéen ; *l*, lamelle ; *o*, globule osmiophile ; *mp*, membrane du plaste ; *mc*, membrane cytoplasmique. (Extrait du *Journal de Microscopie* GIRAUD, 1962).

## PLANCHE IX

Coloration négative à partir de fragments de chloroplastes de Maïs, sans fixation préliminaire. On observe les grains *g* qui composent les lamelles et les disques sur plusieurs plans successifs ; entre les flèches lamelle double vue de champ.  $\times 128\ 000$ .





La membrane plastidale, doublée vers l'intérieur par la lamelle périphérique l'entoure complètement. Au niveau du point d'attache du pyrénioïde se trouvent de nombreux globules lipidiques. A cet endroit aussi les lamelles sont moins régulièrement disposées. Il s'en détache des tubes qui, après un parcours assez sinueux, s'enfoncent dans la masse dense du pyrénioïde ; ils forment alors un réseau dans lequel on distingue au centre un profil annulaire. D'autres tubes *t* sont rattachés à la lamelle périphérique. Cette structure complexe est sans doute liée à la position en saillie du pyrénioïde. On trouve des tubes dans d'autres groupes d'algues (GIRAUD, 1962), mais ils ne forment jamais de ramifications aussi ordonnées et nombreuses.

Dans tous les cas, il faut noter que ces tubes et ces lamelles qui pénètrent dans le pyrénioïde sont toujours reliés à l'ensemble lamellaire du plaste.

#### 4. *Codium tomentosum* et *Bryopsis plumosa* (Chlorophycées)

Les Chlorophycées ont en général de nombreuses lamelles s'étendant d'un bout à l'autre du plaste, assez serrées, mais non groupées en faisceaux comme chez *Vaucheria*. Des empilements de saccules, chez *Chlamydomonas* par exemple (SAGER et PALADE, 1956) rappellent la disposition des disques granaires des Végétaux Supérieurs.

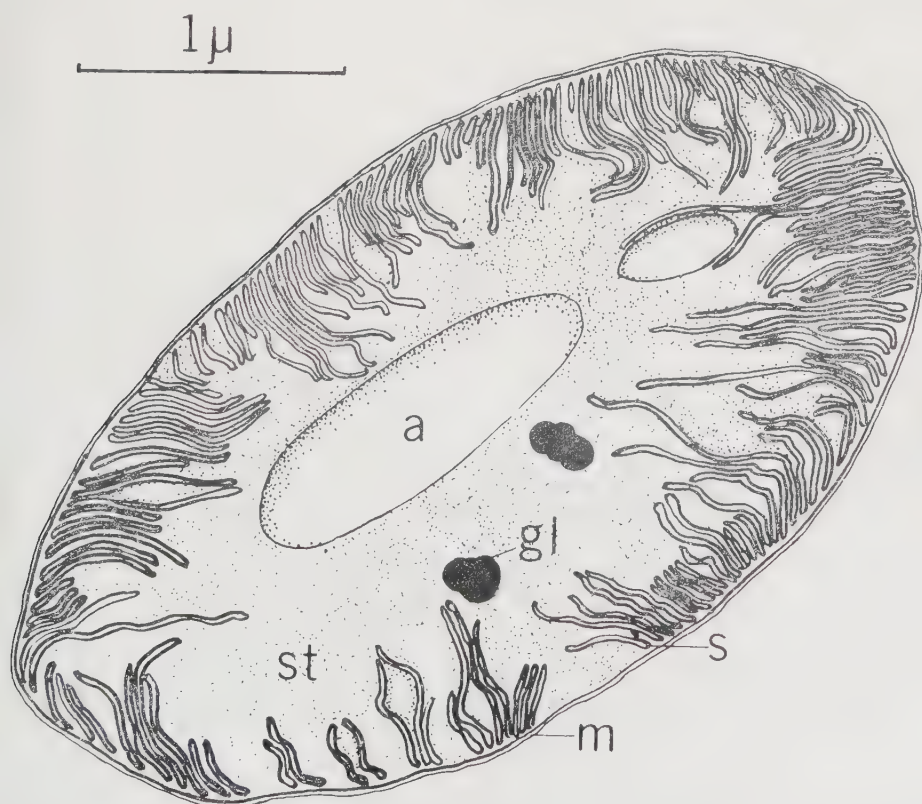


FIG. 16. — Plaste de *Codium tomentosum*. — Schéma montrant la disposition spéciale des lamelles dont une extrémité *s* est toujours le long de la membrane, *m*, du plaste ; *a*, amidon ; *gl*, globule lipidique ; *st*, stroma.

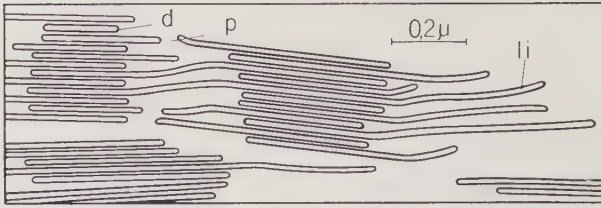


FIG. 17. — Chloroplaste de *Zea mays* montrant le détail de l'empilement des disques granaires, *d*, et des lamelles, *li* ; *p*, perforation dans les lamelles.

Les chloroplastes des *Codiales* sont d'un type voisin, mais avec des particularités dans l'arrangement des lamelles. Celles-ci se terminent toutes le long de la membrane, souvent perpendiculairement et se disposent radialement. La longueur des profils lamellaires ne dépasse pas le tiers du diamètre du plaste, les lamelles laissent une zone centrale où s'accumule l'amidon chez *Codium tomentosum* (fig. 16) et où se différencie un pyrénioïde chez *Bryopsis* (Planche V). Les saccules ont une épaisseur de 180 Å environ.

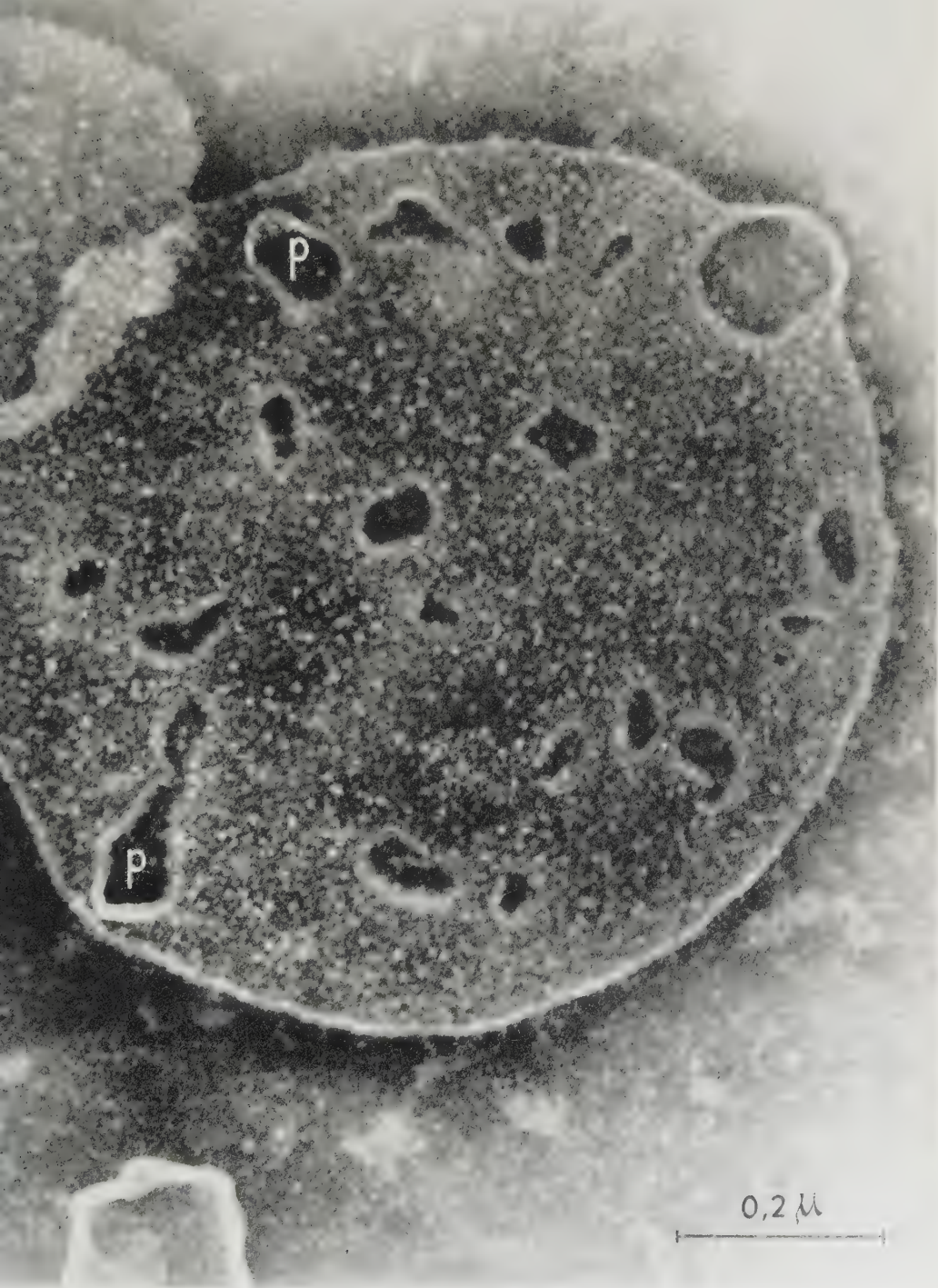
### 5. Comparaison avec les chloroplastes de Maïs

A titre de comparaison, des chloroplastes de Maïs ont été observés et l'épaisseur des lamelles et des disques granaires a été mesurée. Cette épaisseur oscille autour de 170 Å. Les disques granaires ne sont souvent constitués que de lamelles générales qui viennent se terminer au niveau du granum et alternent plus ou moins régulièrement avec de véritables disques (BUVAT, 1963). Les lamelles, qui se prolongent en lamelles intergranaires, sortent fréquemment de part et d'autre du granum avec une alternance assez régulière (fig. 17). Cette structure apparaît clairement sur des chloroplastes isolés mis pendant une demi-heure dans l'eau distillée. Le chloroplaste a doublé de volume, les disques et les lamelles sont gonflés. La zone claire centrale, hydrophile, des saccules se gonfle comme par turgescence ; l'unité membranaire étirée, probablement altérée, constituerait la membrane semi-perméable qui permet ce phénomène. FREY-WYSSLING et STEINMANN (1953) ont obtenu un gonflement identique observé par les méthodes d'ombrage sur les disques granaires isolés. Grâce aux photographies de chloroplastes gonflés, on peut mettre en évidence avec netteté la succession des disques et des lamelles qui se superposent dans le granum (Planche VII *a* et *b*). Les chloroplastes isolés ont souvent leur membrane éclatée. Dans les solutions d'extraction, ils se gonflent légèrement. Leur stroma diffuse dans le milieu, cette perte se traduit par une diminution de leur activité enzymatique. Le chloroplaste réagit alors comme un organite incomplet.

Les arrangements des lamelles des plastes peuvent être très divers. Trois types principaux sont cependant classiquement décrits : 1) celui des Chlorophycées, 2) celui des Xanthophycées que l'on retrouve chez les Phéophycées, les Chrysophycées, etc. (Ces Algues qui possèdent toutes des pigments bruns sont souvent réu-

### PLANCHE X

Fragment de lamelle de chloroplaste de Maïs avec ses nombreuses perforations *p*, coloration négative sans fixation.  $\times 150\ 000$ .





nies sous le terme de Chromophytes) 3) celui des Rhodophycées dont on peut rapprocher les Cyanophycées. Malgré l'absence de membrane limitante, ces dernières ont aussi des lamelles doubles isolées qui ont souvent été observées (NIKLOWITZ et DREWS, 1956 ; LEFORT, 1960) et que j'ai retrouvées chez *Aphanocapsa thermalis*.

A ces trois types classiques, il serait nécessaire d'ajouter celui qui est illustré par le *Codium tomentosum* et le *Bryopsis plumosa* et qui semble caractériser les Codiales.

Chez les Rhodophycées, la possibilité de déformation du plaste peut se trouver liée à l'isolement des lamelles qui opposent moins de résistance aux mouvements du stroma. Elles peuvent aussi se fragmenter facilement ainsi que le prouvent les terminaisons renflées des saccules qui sont en face les unes des autres à un même niveau. Le plaste peut alors s'allonger et même se diviser. BOUCK (1962) a observé chez *Lomentaria baileyana* des divisions qui se produisent perpendiculairement aux lamelles.

## B. — ÉTUDE STRUCTURALE PAR LA COLORATION NÉGATIVE

L'étude de la composition macromoléculaire des lamelles a été faite par les méthodes d'ombrage (FREY-WYSSLING et STEINMANN, 1953). En 1957, FREY-WYSSLING a donné un modèle de granum dont les membranes sont formées de particules globulaires de 65 Å de diamètre, chaque globule étant un complexe de macromolécules lipoprotéiques (50 % de protéines, 30 % de lipides). Récemment, PARK et PON (1961) ont décrit chez *Spinacia oleracea*, sous le terme de quantasomes, des particules élémentaires d'une dimension de 200 Å sur 100 Å d'épaisseur, dont l'assemblage formait les membranes granaires et intergranaires. Il était intéressant d'examiner comment ces éléments se présentent dans les plastides des algues. La technique d'ombrage peut pour cela être remplacée par une méthode employée couramment pour l'étude morphologique des virus et des macromolécules, la *coloration négative* qui a l'avantage de conserver très fidèlement la forme des particules. La dessiccation qui est nécessaire avant l'ombrage, entraîne des déformations et des réductions possibles de volume. En outre, la *coloration négative* offre une bien meilleure résolution que les coupes contrastées normalement. Le contrôle de cette méthode a été fait en étudiant les lamelles des chloroplastes de Maïs (GIRAUD, 1963).

### 1. Essai de la *coloration négative* sur les chloroplastes de Maïs

Après les opérations d'isolement, les plastides et leurs fragments sont recueillis sur les membranes porte-objet où se fait la *coloration* phosphotungstique.

Les fragments de plastides sont aisément reconnaissables sur ces préparations. On trouve des empilements de disques granaires dont la forme caractéristique rappelle les photographies de granums obtenues après ombrage. La structure granulaire est visible, elle est identique pour les disques et les lamelles intergranaires (Planches VIII, IX et X). Ces lamelles sont percées de nombreux trous à bords irréguliers de quelques dixièmes de  $\mu$  (Planche X). Ces trous correspondent aux interruptions visibles sur coupe (Planche VI). Les lamelles, en dehors de leur passage dans les granums, forment des surfaces ajourées, ce qui peut être rapproché des observations de WEIER et THOMSON (1962) et WEIER, STOCKING, THOMSON et DREYER (1963) sur les chloroplastes de *Nicotiana rustica*.

La taille des grains est déterminée après un grand nombre de mesures. Afin de diminuer l'erreur due à l'imprécision sur leur limite, épaissie par l'acide phospho-

tungstique, on mesure des piles de plusieurs grains. Ceux-ci sont arrondis et alignés assez régulièrement. Leur diamètre est de 120 Å.

Les lamelles peuvent se trouver sur champ. On les voit alors appariées, formant deux couches claires séparées par une couche sombre. L'épaisseur totale de l'ensemble est de 170 Å. Celle de chaque grain ne dépasse pas 85 Å. Ce sont des disques aplatis comme les quantasomes de PARK et PON (1961).

Ces résultats ont été obtenus sans fixation ou après fixation au formol. Les préparations fixées permettent d'observer des globules lipidiques du stroma du chloroplaste, accolés aux lamelles.

## 2. *Stichochrysis* sp.

Les préparations en *coloration négative* des fragments de plastes de *Stichochrysis* sont difficiles à interpréter, car les détails des structures sont très fins. Sur la photographie de la Planche XI, on peut voir un de ces fragments. La granulation est beaucoup moins perceptible que chez le Maïs à un même grossissement. La dimension des grains est voisine de 40 Å. Les stries qui bordent les plages granulées sont des bords de lamelles. Leur empilement est très serré. Pour mesurer leur épaisseur, on a cherché des vues de champ des saccules. On observe, comme chez le Maïs, deux couches claires séparées par une couche sombre. L'épaisseur de ces lamelles doubles est d'environ 80 Å. Après fixation au formol, les mêmes détails sont visibles, mais ici les globules lipidiques sont très nombreux.

On constate la concordance entre les résultats obtenus par la méthode des coupes et par la *coloration négative*. La structure très fine est vérifiée par cette méthode. La discussion des homologations entre les deux types de structure sera faite plus loin.

## 3. Rhodophycées

Le seul exemple de Floridée étudié ici en détail est celui de *Rhodomela subfusca*. Les fragments de plaste sont reconnaissables dans les préparations car les feuillettes des lamelles sont seulement groupés par deux. Le diamètre des granules vus de face est d'environ 80 Å et, sur une vue de champ, on a pu mesurer l'épaisseur d'un saccule (170 Å).

Les plastes de *Rhodorus* après rupture de la paroi cellulaire par les ultrasons ne sont plus observables par la *coloration négative*, les structures sont dégradées. Des fragments de plastes verts ont pu être obtenus après broyage dans le microbroyeur DANGOUMAU. La taille des grains mesurés en *coloration négative* est d'environ 70 Å.

## 4. *Codium tomentosum*

La *coloration négative* fait apparaître un entrelacs de lanières de largeur variable mais toujours très étroites par rapport à leur longueur. Quelques surfaces un peu plus larges sont percées de trous. Les lamelles ne forment pas de feuillettes comme dans les autres cas étudiés, mais de longs rubans (Planches XII et XIII).

A la disposition différente des lamelles, observées en coupe, s'ajoute donc chez *Codium* une modification de leur forme elle-même.

## PLANCHE XI

Fragment de plaste de *Stichochrysis* prélevé dans le culot de centrifugation à 2 000 G et observé en *coloration négative*. Les lamelles doubles sont visibles entre les deux flèches, les grains qui composent les lamelles sont beaucoup plus petits que dans le cas du Maïs. Fixation préalable au formol.  
127 030.





Les lamelles sont composées de particules arrondies dont certaines sont très visibles car elles semblent faire saillie à la surface (Planche XIII). Quelques grains sont aussi isolés dans la couche dense d'acide phosphotungstique. On observe un aspect identique chez le *Maïs* ; il semble que ces particules isolées ou groupées soient arrachées à leur structure par les procédés d'extraction et qu'elles soient dispersées au hasard de la *coloration négative*. Ces grains globuleux ont un diamètre voisin de 110 Å, leur épaisseur est de 80 Å environ. Si l'on reconstitue, dans l'espace, les lamelles du plaste de *Codium*, on obtient un ensemble de languettes étroites, assez flexueuses, en général radiales qui hérissent la paroi interne d'un plaste en fuseau. Les languettes laissent un espace libre au centre, occupé par le stroma et les grains d'amidon.

Parmi les Chlorophycées, les Codiales ont donc des chloroplastes assez particuliers. Il serait intéressant d'un point de vue systématique de voir si toutes les Siphonales et les groupes voisins sont de ce type ou non.

## 5. Comparaison des mesures obtenues d'après les coupes et par la *coloration négative*

Il est utile de regrouper les résultats obtenus dans ces deux parties car les modèles observés ne se ressemblent pas. Les lamelles sont toujours formées de couches de grains, toutes identiques entre elles. Ces particules ont la forme de disques chez le *Maïs* ( $120 \times 85$  Å) mais doivent être globuleuses chez *Rhodomela* (80 Å) et *Stichochrysis* (40 Å).

Les mesures d'épaisseur de ces granules font apparaître qu'il en existe deux couches dans une lamelle double. La lamelle élémentaire fait partie d'une de ces couches (voir fig. 19). Il est difficile de faire coïncider le schéma des unités membranaires avec cette conception granulaire. On constate seulement ici la similitude d'épaisseur de ces deux formations. Leur interprétation sera discutée plus loin.

La zone centrale du saccule fixe l'acide phosphotungstique, puisqu'elle n'apparaît pas en *coloration négative*. Elle est probablement composée par une protéine à structure ouverte dans laquelle pénètre l'acide phosphotungstique (voir VALENTINE et HORNE, 1962).

L'étude cytologique et macromoléculaire des plastes apporte des précisions sur la constitution des lamelles, mais montre que les résultats peuvent varier quantitativement selon les espèces. Dans l'ensemble, les mesures sont du même ordre de grandeur et cohérentes, sauf pour *Stichochrysis* qui semble avoir une structure d'un module réduit de moitié.

## APPORT DE LA MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE A LA CONNAISSANCE DE LA LOCALISATION DES PIGMENTS PHOTOSYNTHÉTIQUES

L'observation au microscope électronique permet de compléter les résultats de l'étude pigmentaire de l'appareil photosynthétique. Il est possible par exemple d'estimer les surfaces lamellaires d'après la forme et les dimensions des plastes. On constate que ces dimensions varient sous l'effet de milieux hypo- et hypertoniques et qu'on peut les mesurer avec une précision plus grande qu'à l'aide du microscope photonique. Enfin, on a étudié des réactions caractéristiques de l'appareil photosynthétique comme la réaction de MOLISCH, qui sont susceptibles, par leur localisation précise, de donner des renseignements sur le fonctionnement des plastes.



En ce qui concerne *Stichochrysis*, le calcul est plus difficile, car le plaste a une forme assez variable. Le nombre des couches denses, donc des lamelles simples, est souvent voisin de 100. Les cellules de forme cylindrique ont été mesurées au microscope photonique et à partir des coupes au microscope électronique. Dans ce dernier cas, les valeurs sont plus faibles car les plans de coupe sont diversement orientés. On peut estimer les dimensions moyennes de la cellule à  $4 \mu$  de diamètre sur  $5,2 \mu$  de hauteur ; le plaste est pariétal, on peut en assimiler l'infrastructure lamellaire à un empilement de calottes sphériques qui réalisent un cylindre dont la surface de base serait convexe. Le calcul sera donc établi à partir du rayon de la sphère ( $R = 2,6 \mu$ , moitié de la hauteur de la cellule) et de la corde  $AB = 4 \mu$  (fig. 18 b). La surface d'une lamelle simple est donc de  $15 \mu^2$ , la surface totale est par conséquent de  $1\,500 \mu^2$ . La quantité de molécules de chlorophylle étant de  $7,5 \times 10^8$  molécules par cellule (voir page 217), l'espace disponible est de  $200 \text{ \AA}^2$  ce qui est aussi de l'ordre de grandeur requis par les dimensions des molécules de chlorophylle.

Ces résultats sont conformes aux conceptions habituelles selon lesquelles la chlorophylle forme un pavage dense à la surface des lamelles.

## B. — MESURE DES MOLÉCULES DE BILIPROTÉINES

Dans le cas des Rhodophycées, il est intéressant de connaître le nombre de molécules de biliprotéines par cellule pour vérifier éventuellement l'hypothèse selon laquelle une monocouche de ces protéines s'étend parallèlement à la surface lamellaire au voisinage de la chlorophylle. Il est nécessaire pour cela de connaître l'encombrement stérique d'une molécule de biliprotéine. FREY-WYSSLING (1957) prend pour base leur poids moléculaire, voisin de 280 000, ce qui correspond à 16 unités SVEDBERG, et les suppose globulaires, il estime le diamètre d'une telle molécule à 88 Å, lorsque la protéine est déshydratée. Dans la cellule il faut supposer que les protéines sont gonflées, donc plus grosses. Une vérification peut être donnée par la *coloration négative*. Une solution de phycoérythrine, purifiée par passage sur colonne de phosphate tricalcique a été pulvérisée avec de l'acide phosphotungstique à 2 % sur des grilles de carbone. L'observation a été faite au microscope électronique « SIEMENS » en collaboration avec J.P. THIERY. Les diamètres des molécules de biliprotéines mesurées sur les photographies (grossissement 240 000) sont voisins de 130 Å. Ces macromolécules sont subsphériques. Les mesures n'ont pas été répétées sur des solutions de phycocyanine ; le poids moléculaire est dans ce cas, légèrement inférieur à celui de la phycoérythrine, mais la différence ne doit pas être très sensible. La surface d'un pavage de biliprotéines comprenant  $2 \times 10^7$  molécules est de  $2 \times 10^7 \times 13\,200 = 2,6 \times 10^{11} \text{ \AA}^2$  soit  $2\,600 \mu^2$ . La surface lamellaire n'ayant que  $440 \mu^2$ , il n'est donc pas concevable que les biliprotéines forment une monocouche parallèle à celle des molécules de chlorophylle. Il semblerait plutôt qu'il y ait six couches superposées au-dessus de chaque lamelle. Si le diamètre des biliprotéines déshydratées est trop faible, celui mesuré en *coloration négative* risque d'être trop grand par rapport au diamètre de ces protéines *in vivo*. On peut le supposer de 100 Å, le calcul montre alors qu'il y aurait quatre couches de biliprotéines au dessus de chaque lamelle.

## C. — ÉTUDE DES MODIFICATIONS CYTOLOGIQUES PROVOQUÉES CHEZ *RHODOSORUS MARINUS* PAR LES VARIATIONS DE CONCENTRATION DU MILIEU

Les effets des variations de la concentration saline du milieu sur les infrastructures ne sont pas facilement observables en microscopie électronique. La fixation,

surtout au permanganate de potassium, l'inclusion dans la gélose formolée à 35 °C, les bains d'alcool, modifient considérablement l'état d'hydratation de la cellule. L'estimation de ces effets n'est pas très aisée, si l'on ne se limite pas aux modifications de grande ampleur.

Il faut donc souvent provoquer de grandes variations de milieu qui entraînent des modifications importantes de la cellule. Le gonflement des lamelles dans les chloroplastes isolés de Maïs, ainsi qu'il a été indiqué plus haut, est réalisé par le passage de la suspension de chloroplastes dans l'eau distillée et l'homogénéisation au POTTER. Les chloroplastes sont pour la plupart gonflés. Il semble que ce soit la substance intralamellaire qui attire l'eau. Pour le *Rhodorus*, les mesures de variation de taille de cellules ont été faites au microscope photonique ; les résultats sont résumés dans le tableau III :

TABEAU III

Mesures du diamètre (en  $\mu$ .) des cellules de *Rhodorus* plongées et maintenues dix minutes dans différents milieux de concentration variable

| Eau distillée et Milieu normal dilué 4 fois (8 g/l) | Milieu normal dilué 2 fois (16 g/l) | Milieu normal (32 g/l) | Chlorure de sodium 2M | Chlorure de sodium 4M |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------------|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| 7,2                                                 | 6,9                                 | 5,3                    | 4,1                   | 4,1                   |

Les cellules qui avaient subi un gonflement dans l'eau distillée diminuent de volume lorsqu'on les met ensuite dans une solution de chlorure de sodium 4 M. Le phénomène est donc réversible.

L'eau distillée détermine un doublement de volume et la solution de chlorure de sodium 4 M une diminution de 50 % par rapport aux cellules normales. Ces effets doivent avoir une répercussion sur le volume du plaste. L'observation des modifications que ces chocs osmotiques sont susceptibles d'apporter aux plastes ne peut être faite qu'à l'aide du microscope électronique. L'expérience met en évidence une très grande variation du volume plastidal. Trois lots d'algues sont comparés, un lot témoin est maintenu dans un milieu à concentration habituelle (32 g/l), un deuxième lot a séjourné dans un milieu hypotonique (8 g/l) et un troisième dans une solution hypertonique de chlorure de sodium 4 M (232 g/l). Les algues y sont laissées dix minutes, puis elles sont fixées dans un mélange tampon-permanganate de potassium isotonique du lot auquel il est destiné, de sorte qu'aucune variation osmotique ne vient modifier la cellule au cours de la fixation. Plusieurs auteurs (BRODY et VATTER, 1959) ont utilisé des milieux saccharosés pour la fixation, car les algues fixées avec le fixateur seul ont souvent les caractéristiques que l'on trouve ici dans les algues placées en solution hypotonique.

On a vérifié au microscope photonique que les algues fixées ne changent pas de taille pendant le lavage à la solution alcoolique à 25 °. La déshydratation et l'inclusion sont ensuite exécutées de façon habituelle.

PLANCHE XIII

Autre vue de plaste de *Codium tomentosum* montrant les grains *g* groupés sur les lamelles ou isolés dans l'acide phosphotungstique ; entre les flèches : épaisseur d'une lamelle double. Coloration négative, sans fixation préalable.  $\times 100\ 000$ .

Les tailles des cellules correspondent à celles mesurées en microscopie photomicroscopique. Les algues mises dans le milieu hypertonique ont un aspect contracté, le plaste occupe tout le pourtour de la cellule. L'arrangement des lamelles est très régulier (Planche XVIII *b*). Elles sont peu sinueuses et l'épaisseur de l'espace interlamellaire varie peu d'un bout à l'autre de la cellule. Il diffère selon les coupes mais reste compris entre 600 et 1 000 Å. On observe aussi que la vacuole est petite et souvent peu visible. L'amidon floridéen, habituellement incolore, est assez sombre et ombré sur son pourtour. L'aspect des cellules dans le milieu hypotonique est tout autre, surtout en ce qui concerne leur plaste (Planche XVIII *a*). Les lamelles sont très sinueuses, par endroits elles restent assez resserrées, mais ailleurs elles s'écartent fortement les unes des autres ( $0,3 \mu$ ), comme entraînées par le gonflement du stroma qui occupe un volume beaucoup plus grand. Le stroma forme des boursoufflures sur le pourtour du plaste ; sa structure devient granuleuse. Les mitochondries sont aussi gonflées ; l'amidon reste incolore.

Les algues du milieu normal sont dans un état intermédiaire. Le plaste n'a aucune boursoufflure, les lamelles sont assez parallèles, mais le plaste n'occupe plus tout le pourtour cellulaire. La vacuole est toujours bien visible.

Cette expérience confirme que le plaste subit des modifications significatives sous l'action de variations importantes de la pression osmotique dans la cellule. Il réagit comme un osmomètre.

Dans le lot d'algues placées en milieu hypotonique, aucune lésion de la cellule n'est visible. Il doit cependant en apparaître plus tardivement, car un séjour prolongé dans ce milieu tue les algues.

#### D. — ÉTUDE DE LA RÉACTION DE MOLISCH AU MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE

La détection et la localisation d'une réaction au microscope électronique peuvent se faire facilement s'il se forme un précipité dense aux électrons. On en trouve un exemple avec les réactions cytochimiques du fer (THIERY, 1962) et avec la réaction de MOLISCH ou réduction du nitrate d'argent à la lumière dans les chloroplastes *in vivo*. Les résultats de BROWN, MOLLENHAUER et JOHNSON (1962), obtenus avec les cellules des feuilles de plusieurs Angiospermes, semblent intéressants, car le précipité d'argent est localisé en dehors des granums mais au niveau des lamelles intergranulaires (à leur surface ou à l'intérieur). La discussion de ces résultats est difficile et les auteurs n'en tirent aucune conclusion précise. Cependant, l'absence de précipité dans les granums semble indiquer que la chlorophylle n'intervient pas directement. L'action de la lumière reste alors très énigmatique. Le rôle de l'acide ascorbique avancé par de nombreux auteurs est aussi à discuter.

La réaction de MOLISCH serait particulièrement intéressante pour ce travail, si elle était liée assez directement à la photosynthèse ; THOMAS, POST et VERTREUT (1954) ont, en effet, prouvé que le spectre d'action de cette réaction rappelle la courbe d'absorption de la chlorophylle. Les observations suivantes semblent en accord avec ce résultat.

##### 1. La réaction de MOLISCH précisée sur les chloroplastes de Maïs

Il est possible de compléter les observations de BROWN, MOLLENHAUER et JOHNSON (1962) en étudiant les structures du chloroplaste soit par *coloration* à l'acétate d'uranyle, soit par fixation du matériel au tétraoxyde d'osmium.

Le nitrate d'argent joue déjà un rôle d'agent fixateur, ce qui limite la durée de la réaction ; on peut par la suite faire des *colorations*. Si les *colorations* permanganiques dissolvent le précipité d'argent, l'acétate d'uranyle donne par contre un assez bon contraste. Les préparations obtenues par cette méthode ont des chloroplastes remplis d'un précipité uniforme réparti sur les lamelles intergranaires qui apparaissent plus denses que le stroma. Les alignements de grains d'argent sont réguliers (Planche XIV *a*) ; chacun de ces alignements coïncide avec le profil d'une lamelle élémentaire.

La dimension de ces grains est de 60 à 120 Å, elle reste toujours inférieure à celle des grains d'argent précipités hors du chloroplaste.

Sur les préparations témoins, faites à l'obscurité, les chloroplastes sont généralement dépourvus de grains d'argent. Lorsque des grains d'argent existent néanmoins, ils sont de grande taille (200 à 500 Å), comparables à ceux que l'on observe sur les membranes cytoplasmiques et dans les plasmodemes.

La fixation par le nitrate d'argent est assez rapide, car sur des fragments de feuille laissés pendant 10 mn à l'obscurité dans le réactif de MOLISCH, la réaction ne se produit plus. Comme il a été dit plus haut, on améliore la fixation en ajoutant, 1 ou 2 mn après le début de la réaction, une solution de tétroxyde d'osmium à 0,1 ou 0,2 %. Dans ce cas, la structure du chloroplaste est très reconnaissable (Planche XIV *b*) ce qui permet de vérifier que le précipité est localisé en dehors des granums, cependant il est souvent plus dense à leur périphérie que dans les autres zones du plaste. Sur les coupes parallèles aux lamelles, on observe les auréoles denses de grains d'argent qui entourent les disques granaires arrondis. L'accumulation du précipité se produit sur le bord des lamelles qui se trouvent en contact avec le stroma. Le précipité forme des chapelets de grains (Planche XIV *b*).

Ces figures suggèrent que la fixation pourrait modifier le déroulement de la réaction de MOLISCH, en l'arrêtant plus rapidement. Dans cette hypothèse, le pouvoir réducteur proviendrait donc des granums et diffuserait le long des lamelles.

Le déroulement de la réaction peut être arrêté assez tôt si on ajoute le fixateur rapidement (30 s), ou au contraire être poursuivi si on laisse le nitrate d'argent agir plus longtemps (5 mn) avant la fixation. Les chloroplastes qui n'ont eu que 30 s pour réduire le nitrate d'argent ont cependant beaucoup de précipité, formé de petits grains répartis sur les lamelles intergranaires. Le précipité n'est pas uniquement localisé autour des granums. Avec les chloroplastes fixés au bout de 5 mn, les images ont un aspect assez identique. Le précipité est, selon les chloroplastes, plus ou moins abondant sans que l'on puisse dire qu'il est quantitativement plus important que dans le lot précédent. L'aspect du précipité accumulé autour des granums est donc assez peu significatif.

Tous les plastes ne réagissent pas et quelques-uns n'ont de précipité qu'à leur périphérie ou bien d'un seul côté. La vitesse de pénétration limite la réaction. Ces

#### PLANCHE XIV

- a.* Portion de chloroplaste de Maïs ayant subi la réaction de MOLISCH, contrasté à l'acétate d'uranyle, la fixation étant assurée par le nitrate d'argent. Les lamelles *l* sont opacifiées par l'acétate d'uranyle et on peut constater notamment que les espaces sans précipité correspondent bien à des granums *gr*. Les grains d'argent *ag* sont alignés le long des lamelles.  $\times 65\ 000$ .
- b.* Chloroplaste de Maïs fixé au tétroxyde d'osmium à 0,1 %, 2 mn après le début de la réaction au nitrate d'argent (à 0,5 %). Les granums *gr* apparaissent striés. Le précipité est réparti en dehors des granums et forme des amas sur leur pourtour ; en *ag* grains d'argent en chapelets.  $\times 65\ 000$ .

cas particuliers expliquent les descriptions de figures en calottes faites par PEKAREK (1938). Les expériences réalisées à 3,5 °C ont montré que les chloroplastes réagissaient moins à cette température qu'à la température ordinaire, on constate cependant les auréoles de quelques grains d'argent autour des granums.

Les expériences sur le Maïs apportent peu de faits nouveaux sur le mécanisme de la réaction. L'absence de précipité dans les granums est difficilement explicable. Peut-être, le nitrate d'argent ne peut-il pas pénétrer par suite de la configuration des granums eux-mêmes.

Des essais sur les chloroplastes isolés n'ont donné aucun résultat, il se forme seulement quelques grains de précipité de grande taille, éloignés les uns des autres et sans relation constante avec les lamelles. Avant la réaction, les chloroplastes sont lavés pour éliminer le tampon (tris-maléate ou phosphate) qui provoquerait un précipité d'argent parasite. Les chloroplastes sont peut-être trop altérés pour que la réaction réussisse. Elle a pourtant été obtenue par THOMAS, POST et VERTREGT (1954) sur des fragments de granums.

## 2. La réaction de MOLISCH chez les algues

Le cas des Algues est intéressant, car elles possèdent des chloroplastes sans granum.

On peut observer déjà, chez les plastes agraires de Maïs, un précipité le long des lamelles. C'est également ce qui se produit avec les Algues.

Chez la *Vaucheria*, les grains d'argent sont de forme irrégulière et de petite taille. Le témoin de la réaction contient déjà des grains d'argent sur les lamelles, mais en faible quantité par rapport aux plastes exposés à la lumière. La réaction n'est pas toujours très positive ; elle dépend de l'état du matériel qui n'est pas très contrôlable.

Pour vérifier avec plus de sécurité si le précipité est bien localisé sur les lamelles, il est nécessaire de choisir une algue dont les lamelles soient bien séparées.

Les Rhodophycées semblent donc constituer un cas favorable. Les expériences ont été faites sur *Rhodomela subfusca* et *Rhodorus marinus*. Ces algues étant toutes deux marines, on élimine les sels du milieu de culture par deux lavages successifs dans une solution de saccharose légèrement hypertonique (20 g/l).

Les expériences sont faites sans fixation ou avec une fixation au tétroxyde d'osmium à 0,2 %. Le nitrate d'argent est employé à la concentration de 0,25 à 0,2 %.

Le précipité est abondant sur les membranes, on l'observe aussi dans les plastes où il est bien localisé sur les lamelles.

Chez *Rhodorus*, les grains d'argent sont disposés en files, constituant deux rangées très rapprochées et parallèles (Planche XV *b* et Planche XVI *a*). La configuration de ces alignements rappelle celle des lamelles. On reconnaît facilement en *lp* la lamelle double qui entoure les autres à l'extrémité du plaste. Le précipité d'argent reproduit donc en pointillé la disposition des saccules, c'est-à-dire que les grains semblent se former au voisinage de la surface des lamelles.

Après fixation osmique ou seulement par *coloration* à l'acétate d'uranyle, on constate bien que la zone située entre les deux files rapprochées est différenciée ; elle apparaît plus claire sur le fond dense du stroma (Planche XVI *b*). La distance entre les deux rangées parallèles, mesurée à partir du centre de chaque grain, est de

120 à 150 Å. Elle est du même ordre de grandeur que l'épaisseur d'une lamelle double. Les grains semblent se former sur la zone périphérique des saccules, mais vraisemblablement dans l'épaisseur de la couche externe des lamelles.

La taille des grains est de 70 Å en moyenne, elle est toujours plus faible dans le plaste qu'au niveau des membranes et en certains points du cytoplasme où une substance réductrice permet une grosse accumulation de grains d'argent.

La fixation osmique fait apparaître nettement la structure du plaste. Chez *Rhodomela* on constate encore (Planche XVII a) que le précipité est réparti sur une file, à la surface externe des saccules.

Dans le cas de *Rhodosorus* et de *Rhodomela*, la répartition du précipité est très précise. Les témoins à l'obscurité contiennent tout au plus quelques grains d'argent, parfois alignés en file unique dans le stroma (Planche XVII b).

La réaction de MOLISCH conduit en outre à une observation intéressante sur le pyrénioïde de *Rhodosorus*. La lamelle qui longe le pourtour du pyrénioïde se recouvre aussi de précipité ; des grains d'argent sont visibles sur le réseau de tubes qui le parcourt (Planche XVI a). On confirme bien ainsi que la lamelle et les tubes du pyrénioïde sont de même nature que les lamelles du plaste.

Les expériences à basse température (3,5 °C) donnent un résultat positif. Le précipité est encore nettement visible, il est réparti en deux rangées parallèles mais quelques zones paraissent ne pas avoir réagi. La réaction existant encore à cette température, il semble qu'elle ne soit pas très thermosensible.

Des essais d'inhibition à l'aide du 3-(4-chlorophényl)-1,1-diméthyl-urée (CMU) ont été tentés. Le CMU est utilisé comme inhibiteur du dégagement d'oxygène photosynthétique. Le CMU est ajouté à la suspension d'algues 12 mn avant le  $\text{AgNO}_3$ . La réaction est aussi positive que sur le témoin. L'inhibition n'a donc pas lieu pour cette réaction, ou elle n'est pas immédiate. Il peut donc être intéressant de connaître approximativement la vitesse de formation du précipité et d'évaluer aussi le pouvoir réducteur nécessaire pour la provoquer. Le fait que les grains d'argent sont en moyenne assez petits par rapport à ceux que l'on observe dans les autres régions de la cellule permet de penser qu'il y a proportionnellement peu de substance réductrice au niveau des lamelles. Le volume des grains est de  $1,8 \times 10^{-7} \mu^3$ , soit  $1,8 \times 10^{-19} \text{ cm}^3$ . Le poids spécifique du précipité est nécessairement supérieur à 1 et inférieur à 10 et la masse d'un grain moyen est donc voisine de  $10^{-18} \text{ g}$ , ce qui

représente  $\frac{10^{-18}}{18 \times 10^{-23}} \simeq 5 \times 10^3$  molécules d'argent. Si on suppose que la réaction dure 5 mn et que la quantité de pouvoir réducteur est proportionnelle au temps, il se

#### PLANCHE XV

- a. Cellule de *Rhodosorus marinus* fixée au permanganate de potassium ; elle servira de structure de référence pour les photographies suivantes : b de la même planche, a et b de la planche XVI. On distingue le plaste avec ses lamelles doubles isolées l ; la lamelle périphérique lp, qui entoure les autres et passe aussi sur le pourtour du pyrénioïde py ; la membrane du plaste m ; les tubes t du pyrénioïde ; af, l'amidon floridéen ; v, la vacuole et gl les globules lipidiques. Les lamelles passent au niveau du point d'attache du pyrénioïde, au milieu de nombreux globules lipidiques.  $\times 44\ 000$ .
- b. Extrémités du plaste de *Rhodosorus* après la réaction de MOLISCH ( $\text{AgNO}_3$  0,5 % dans une solution de saccharose isotonique au milieu de culture, postfixation au tétraoxyde d'osmium à 0,2 %). Les lamelles sont soulignées par le précipité d'argent qui les borde (entre les deux flèches épaisseur d'une lamelle double). La lamelle périphérique lp, est bien visible aussi grâce au précipité. On observe quelques grains d'argent dans le cytoplasme.  $\times 140\ 000$ .

déposerait une dizaine de molécules d'argent par seconde. On peut admettre qu'il y a de une à dix molécules d'argent réduit déposées par seconde.

La régularité de la répartition du précipité le long des lamelles peut être caractérisée par la mesure de la distance qui sépare deux grains d'argent successifs sur un même bord de lamelle. En effet, cette distance est assez constante et varie autour de 100 à 150 Å (fig. 20).

Les Rhodophycées ont donc permis de préciser la localisation du précipité à la surface des lamelles. Ce précipité est régulièrement réparti et formé de grains homogènes de petite taille, mais son origine reste encore à discuter.

## DISCUSSION

### A. — LES PIGMENTS DE *RHODOSORUS MARINUS* ET DE *STICHOCHRYISIS* sp.

#### 1. *Rhodosorus*

Le *Rhodosorus* est classé dans les Bangiophycées de l'ordre des Porphyrariales, au voisinage de *Porphyridium cruentum*. Ce rapprochement est justifié par la composition pigmentaire très semblable des deux Algues. La B-phycoérythrine que l'on trouve chez ces Porphyrariales existe aussi chez une Bangiale, *Smithora naiadum* (AIRTH et BLINKS, 1956), et, dans la classe des Floridophycées, chez une Némalionale, le *Rhodochorton floridulum*, mais dans ces deux derniers ordres, d'autres genres d'Algues possèdent de la R-phycoérythrine, par exemple le *Rhodochorton rothii* (voir O'hEOCHA, 1962). L'absence de chlorophylle *d* semble une des caractéristiques des Rhodophytes inférieures (STRAIN, 1958). Il n'est donc pas étonnant de ne pouvoir la mettre en évidence chez le *Rhodosorus*.

Les variations quantitatives des phycobilines chez les algues en culture sont décrites par MYERS et KRATZ (1955) chez *Anacystis nidulans*, par MOYSE, COUDERC et GARNIER (1957) chez *Oscillatoria subbrevis* et par BRODY et EMERSON (1959) chez *Porphyridium cruentum*. Elles sont provoquées par des variations d'illumination des algues. La différence d'éclairement des cultures *au repos* et des cultures *accélérées* est vraisemblablement la cause des modifications de teneur en biliprotéines observées, les algues placées en faible éclairement synthétisant plus de pigments à phycobilines que les autres.

#### 2. *Stichochrysis* sp.

Les variations de la pigmentation de *Stichochrysis* sp. concernent la chlorophylle *a*. Les conditions de culture sont encore à l'origine des différences pigmentaires.

Les principaux travaux qui ont mis en évidence les formes diverses de chlorophylle *a* sont dus à FRENCH et à ses collaborateurs, notamment BROWN (1962, 1963). Les formes de chlorophylle *a* sont caractérisées par leur absorption dans le rouge ; on peut à la suite de FRENCH, utiliser en ce qui les concerne la nomenclature suivante :  $C_a$  673,  $C_a$  682 et  $C_a$  695, analogue à celle qui est employée pour les différents complexes de la bactériochlorophylle.

Chez la plupart des végétaux, la spectrophotométrie différentielle permet de discerner les trois formes de chlorophylle, mais souvent la forme  $C_a$  682 est prédominante et masque dans les spectres d'absorption les autres bandes. *Stichochrysis*

semble posséder ces diverses formes de chlorophylle dans des proportions inhabituelles. C'est aussi le cas d'*Euglena* et d'*Ochromonas danica* étudiées par FRENCH et ELLIOTT (1958), ALLEN, FRENCH et BROWN (1960). La formation des différents complexes de chlorophylle *a* et leurs proportions sont liées aux conditions de culture, mais pour ces deux organismes les variations pigmentaires sont inverses. Chez *Euglena* les jeunes cultures possèdent un pic d'absorption simple mais au fur et à mesure du vieillissement (22 jours, 36 jours) la forme  $C_a$  695 apparaît de plus en plus nettement. Chez *Ochromonas danica* l'inverse se produit, les algues jeunes ont un pic d'absorption complexe qui devient simple et culmine à 675 m $\mu$  dans les cultures âgées. Les conditions de genèse de ces formes de chlorophylle *a* sont donc liées aux modalités de la croissance. Les algues ne paraissent pas réagir de la même façon en fonction des facteurs du milieu. *Stichochrysis* serait plutôt du type *Euglena*.

Les modifications du milieu qui interviennent dans des cultures âgées concernent le pH et surtout l'appauvrissement du milieu en sels nutritifs; cet appauvrissement provoque un ralentissement de la croissance et le passage d'une période de synthèse active du matériel cytoplasmique et chloroplastique à une période de remaniement pendant laquelle les différentes formes de chlorophylle peuvent apparaître. Il en est de même pour l'apparition du pic à 705 trouvé chez *Euglena*. Lorsque les cultures âgées sont placées à l'obscurité et au froid, pendant une durée d'une semaine au moins, on le voit se développer.

Ce pic est attribué à la phéophytine *a* par BROWN qui a réussi à isoler des fragments de plastes où la forme  $P_a$  705 prédomine. Les spectres d'absorption des extraits à l'éther éthylique permettent de caractériser la phéophytine *a*. Le  $P_a$  705 se trouve en grande quantité dans le *Stichochrysis*, il se forme dans les cultures en faible éclaircissement, en une quinzaine de jours environ.

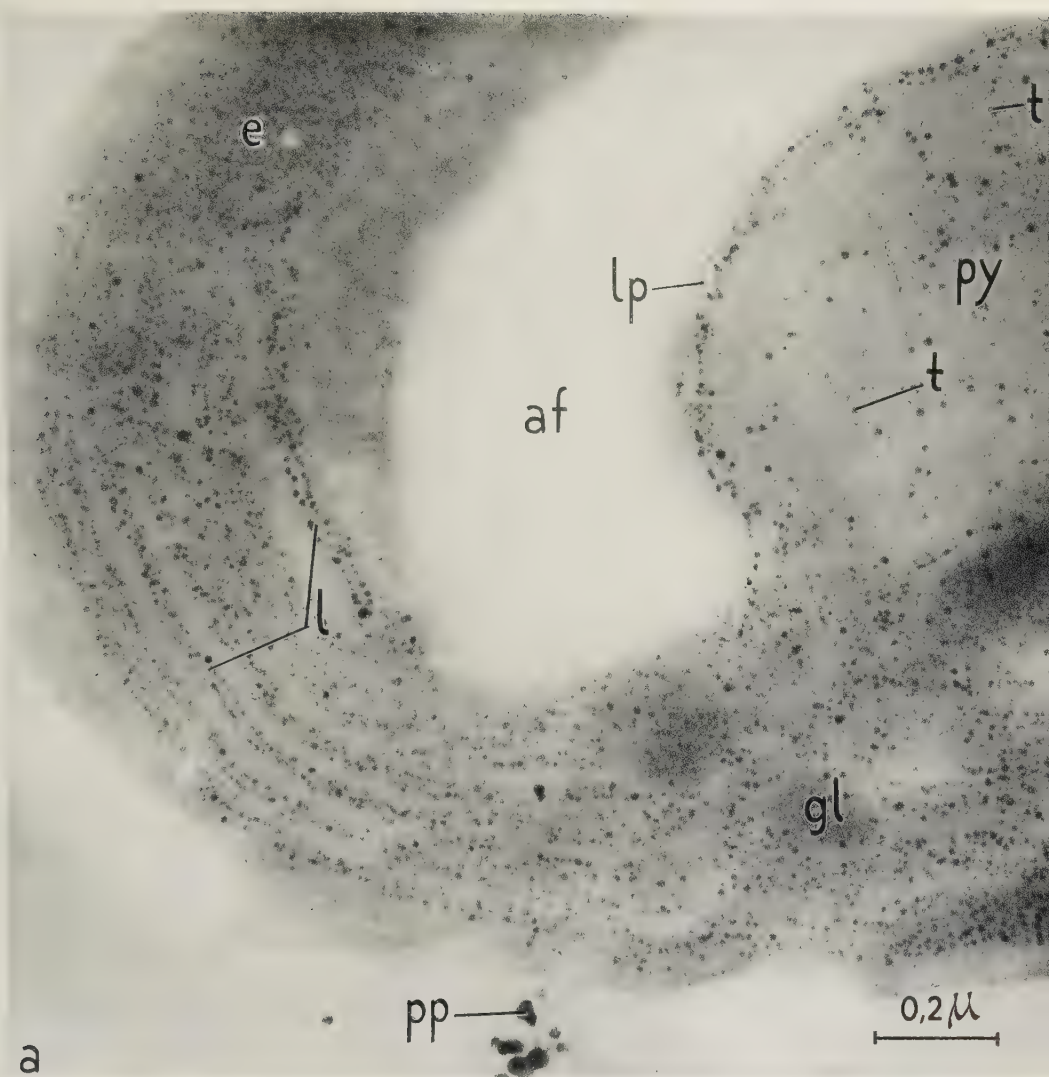
Des essais d'analyse des formes de chlorophylle ont été réalisés sur *Euglena* et *Ochromonas*.

Un chauffage de 15 mn à 45 °C ne fait disparaître que la forme  $C_a$  695. A pH 2, la forme  $P_a$  705 est seule stable. Chez *Ochromonas danica*, l'éclatement des parois cellulaires ou un traitement de 20 mn à 40 °C provoque l'évolution du pic complexe vers la forme simple. Il y a donc bien ici une destruction de certaines formes de chlorophylle.

Chez *Stichochrysis* sp., la bande d'absorption dans le rouge, après broyage des cellules et isolement des fractions plastidiales, présente toujours une disposition des pics d'absorption à 695 et 705. Le pic principal se déplace de 676 m $\mu$  à 672 m $\mu$ . Le chauffage de la suspension pendant 5 mn à 40 °C ne provoque pas ces modifications.

#### PLANCHE XVI

- a. Portion de plaste de *Rhodospirillum rubrum* montrant la répartition du précipité d'argent sur les lamelles *l*, sur la lamelle périphérique *lp* qui passe autour du pyrénioïde *py*. Au niveau des globules lipidiques *gl*, le précipité est moins visible car les lamelles sont irrégulièrement orientées. L'extrémité du plaste *e* est coupée tangentiellement et l'alignement du précipité n'est plus visible. Il se forme des grains d'argent sur les tubes *t* du pyrénioïde ; le précipité *pp* extérieur au plaste est formé de grains plus gros que ceux qui recouvrent les lamelles ; *af* amidon floridéen. A titre de comparaison voir la figure 15.  $\times$  82 000.
- b. Vue de détail d'un plaste de *Rhodospirillum rubrum* après la réaction de MOLISCH et fixation au tétraoxyde d'osmium à 0,2 % ; les coupes sont contrastées à l'acétate d'uranyle. Le précipité est de chaque côté d'une zone claire qui correspond à l'intérieur du saccule (entre les deux flèches).  $\times$  100 000.





Le problème est donc complexe, on peut noter une analogie de comportement entre *Euglena* et *Stichochrysis*. Chez cette dernière algue, la forme  $P_a$  705 est très importante, ce qui explique la grande abondance de phéophytine *a* que l'on obtient après extraction des algues *au repos*.

BROWN a aussi obtenu des pigments de plaste qui contiennent les formes  $C_a$  695 et  $C_a$  673 qui semblent donc plus liées entre elles qu'avec la forme  $C_a$  683. L'existence de ces divers complexes de chlorophylle *a* peut être vérifiée sur les spectres de fluorescence. Les spectres donnés par FRENCH pour *Euglena* sont très voisins de ceux obtenus avec *Stichochrysis*. La fluorescence à 717  $m\mu$  augmente avec l'âge des cultures, parallèlement à la croissance des pics d'absorption à 695 et 705  $m\mu$ .

Comme FRENCH a observé chez *Ochromonas danica* une fluorescence à 708  $m\mu$  qu'il attribue à la chlorophylle  $C_a$  695, la fluorescence à 717  $m\mu$  serait peut-être due à  $P_a$  705.

Il est possible, dans cette hypothèse, que la fluorescence de la forme  $C_a$  695 n'apparaisse pas à côté de celle de  $P_a$  705, de même qu'on ne peut observer la fluorescence de la chlorophylle *b* qui se trouve dans une situation identique vis-à-vis de la chlorophylle  $C_a$  683.

BUTLER (1961) décrit aussi un pigment absorbant à 705  $m\mu$  qu'il relie à la fluorescence à 720  $m\mu$ . Il le considère comme un complexe chlorophylle-cytochrome ou un dimère chlorophyllien.

Dans tous les cas, il semble que l'absorption dans la région 680-700  $m\mu$  soit complexe et que la superposition de plusieurs pigments rende l'interprétation des variations de fluorescence à 717  $m\mu$  difficile, notamment les variations des spectres en écoulement intermittent.

Chez le *Rhodospirillum rubrum* et les Rhodophycées et Cyanophycées en général, où le pic à 720  $m\mu$  est toujours bien visible, il est difficile de choisir une interprétation satisfaisante de son origine. Chez *Porphyridium* FRENCH et ELLIOTT (1958) trouvent un pic d'absorption vers 700  $m\mu$  semblable à celui des cultures âgées d'*Euglena*. La fluorescence à 717  $m\mu$  semble générale chez les végétaux. Ces formes  $C_a$  695 et  $P_a$  705 doivent donc exister toujours, mais à des concentrations très faibles.

La chlorophylle *a* peut donc présenter des modifications d'état physique (formes plus ou moins agrégées) qui sont vraisemblablement liées à des structures protéiques spéciales. Celles-ci sont détruites facilement par des facteurs physiques. L'existence d'une transformation qui semble réversible entre la chlorophylle *a* et la phéophytine *a* *in vivo* est aussi un fait intéressant.

Il faut signaler également l'existence d'un pigment absorbant à 655  $m\mu$  que FREI (1962) a mis en évidence à — 180 °C chez diverses Algues : *Porphyridium cruentum*, *Phormidium persicinum*, *Euglena* sp. Sa signification est inconnue. Il existe peut-être chez *Stichochrysis*.

La chlorophylle *c* a aussi été décelée dans les extraits partiels de cette Chrysophycée. STRAIN (1958) suppose son existence. Sa mise en évidence est difficile parce qu'on la trouve en très faible quantité et qu'elle se dégrade quand on l'isole.

Des conséquences importantes peuvent être tirées de l'étude des diverses formes de chlorophylle *a*.

FRENCH constate que *Ochromonas danica* a un rendement de photosynthèse meilleur que *Ochromonas malhamensis* dont la bande d'absorption dans le rouge est simple.

Les végétaux qui possèdent proportionnellement beaucoup de chlorophylles  $C_a$  673 et  $C_a$  695, d'ailleurs liées, ont donc un rendement de photosynthèse meilleur, car l'énergie lumineuse de longueur d'onde comprise entre 680 m $\mu$  et 700 m $\mu$  peut être transmise ou absorbée directement par la forme  $C_a$  695 qui constitue le système photochimique 2 de la photosynthèse (WITT, MÜLLER et RUMBERG, 1963), ce système 2 interviendrait dans l'émission d'oxygène photosynthétique. Dans le cas où cette forme est présente en très faible quantité, une lumière excitant uniquement la chlorophylle entre 680 et 695 m $\mu$  est peu efficace, car elle ne peut être utilisée que par le système 1. L'addition d'une lumière de plus faible longueur d'onde provoque alors une exaltation de la photosynthèse (effet EMERSON) car les deux systèmes photochimiques fonctionnent simultanément.

BROWN en conclut que l'effet ne doit pas être observable chez *Euglena*, puisque  $C_a$  695 est présent en grande quantité (1963).

Ce résultat serait aussi à vérifier chez *Stichochrysis*. Une étude comparative pourrait être faite entre algues *au repos* et algues en culture *accélérée*.

La seule constatation que l'on puisse faire à ce sujet pour le moment est que le rendement de photosynthèse semble encore bon chez des suspensions de *Stichochrysis* avec une lumière de longueur d'onde 710-720 m $\mu$ .

## B. — LA LOCALISATION DES BILIPROTÉINES DANS LES PLASTES DE *RHODOSORUS*

Trois ordres de faits permettent de préciser la localisation des biliprotéines *in vivo*.

1) Les variations de transfert d'énergie entre biliprotéines et chlorophylle observées sur les spectres de fluorescence.

2) Les modifications cytologiques observées par action des milieux soit hypertoniques, soit hypotoniques.

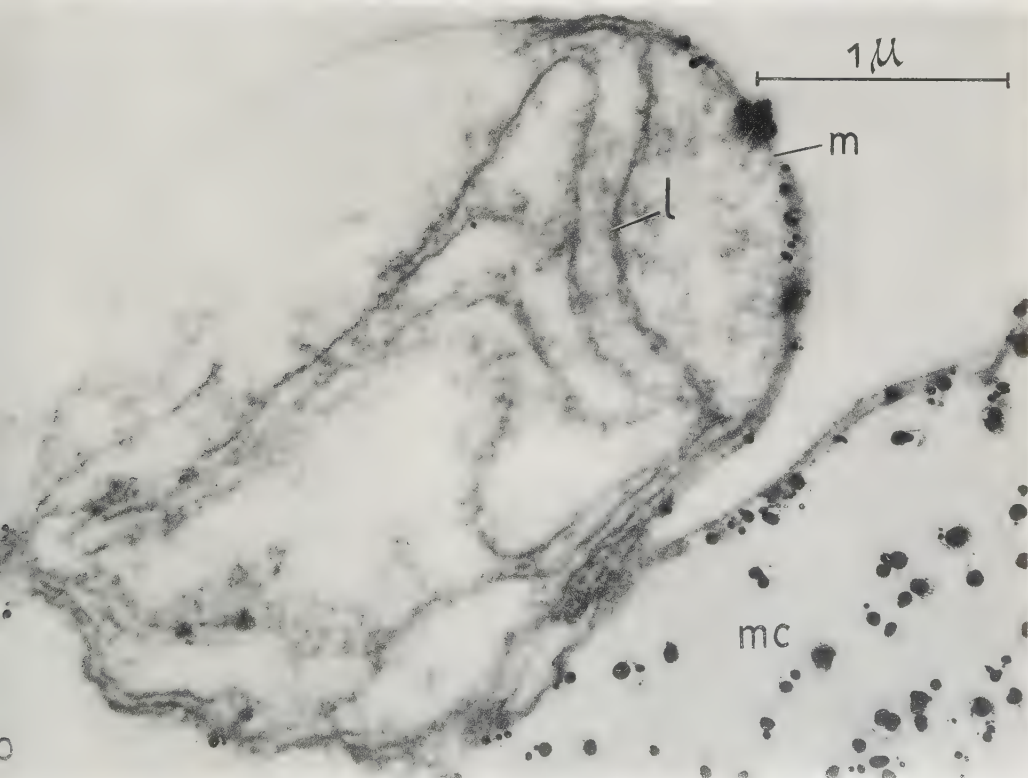
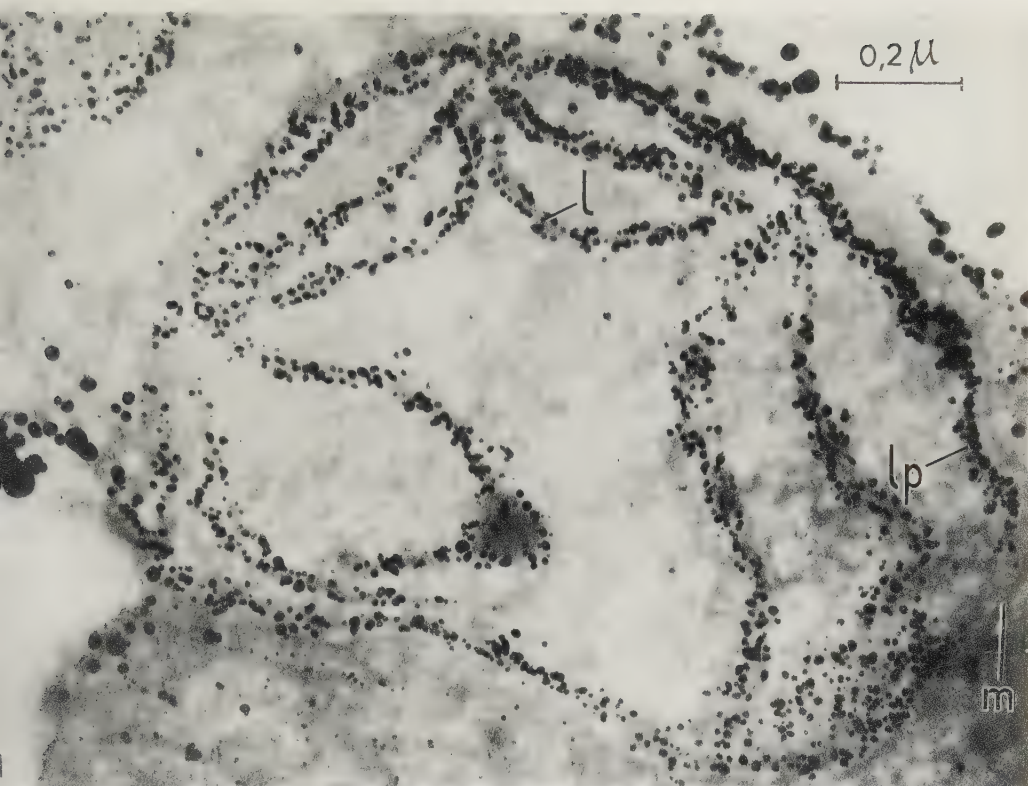
3) Le calcul de la quantité de molécules de biliprotéines dans un plaste.

Les variations de transfert d'énergie entre les phycobiline et la chlorophylle peuvent s'interpréter comme des modifications des distances intermoléculaires entre les deux catégories de pigments. Il est nécessaire pour que ces transferts par résonance puissent avoir lieu avec un rendement de l'ordre de 95 %, que les molécules en cause soient distantes les unes des autres de moins de 50 Å. Si on suppose que cette condition n'est pas réalisée pour toutes les molécules de biliprotéines, on conçoit qu'une partie de l'énergie qu'elles absorbent ne puisse pas être transmise à la chlorophylle. Cela se produira si les molécules de biliprotéines sont dispersées dans le stroma. La disparition de la fluorescence induite de la chlorophylle sous l'action de divers facteurs physiques qui tendent à modifier la structure des plastes (gonflement du stroma, par exemple) ou même à la détruire, vient à l'appui de cette hypothèse.

## PLANCHE XVII

a. Plaste de *Rhodomela subfusca* ayant subi la réaction MOLISCH et après 2 mn une fixation osmique à 0,2 %. Le précipité est localisé sur les lamelles *l*, on distingue la lamelle périphérique *lp* et la membrane du plaste *m* ;  $\times$  80 000.

b. Plaste témoin de *Rhodomela* obtenu par la même méthode mais à l'obscurité ; le précipité est localisé à l'extérieur du plaste, il est abondant dans la membrane cellulaire *mc*.  $\times$  35 000.





L'augmentation de la fluorescence de la chlorophylle dans des milieux très hypertoniques est aussi en accord avec cette hypothèse, car il semble bien qu'il y ait une contraction du plaste avec une diminution des distances intermoléculaires.

Le transfert d'énergie s'améliore aussi quand les algues passent du stade de culture *accélérée* au stade *au repos*. Dans le même temps, la structure de la cellule et notamment l'infrastructure du plaste se modifient. Les dispositions spatiales des divers éléments se régularisent. L'aspect du plaste n'est seulement constant et caractéristique que dans les algues *au repos*. On peut donc considérer que ces transformations tendent vers une amélioration des rapports entre les molécules de biliprotéines et la chlorophylle.

L'étude cytologique semble confirmer les hypothèses émises lors de l'étude physiologique. Etant donnée la taille des molécules de biliprotéines et leur nombre, il est impossible qu'il y en ait une seule couche au voisinage de la couche de chlorophylle. Le calcul montre au contraire qu'il doit en exister au moins trois chez les Cyanophycées, d'après les résultats des dosages sur *Oscillatoria* obtenus par GARNIER (1962), et quatre à six chez *Rhodorus*. Si on suppose toutes les molécules serrées les unes contre les autres, leur épaisseur totale est d'environ 750 Å puisque leurs distances mutuelles ne doivent pas dépasser 50 Å. L'épaisseur maximale qu'elles peuvent effectivement occuper est d'environ 1 300 Å. Nous avons vu dans la partie cytologique de ce travail que les lamelles de *Rhodorus* étaient séparées par une zone de stroma épaisse de 0,1 µ soit 1 000 Å. Le calcul qui vient d'être fait est donc compatible avec la disposition des lamelles.

La localisation des molécules de biliprotéines dans le stroma est très probable. Néanmoins BRODY et VATTER (1959) ont formulé des conclusions opposées, après l'étude de *Porphyridium cruentum*. Ils considèrent que les phycobilines sont liées aux lamelles. Des photographies de plastides de cette algue cultivée à une forte intensité lumineuse montrent que les lamelles sont déformées. Le stroma est vacuolisé et partiellement désorganisé. Comme dans ces conditions la photosynthèse a un rendement aussi bon qu'avec les algues cultivées à faible intensité lumineuse, ces auteurs ont conclu que les phycobilines doivent obligatoirement être liées aux lamelles. Les photographies présentées par ces auteurs correspondent à celles du *Rhodorus* en culture *accélérée* où les modifications sont cependant moins importantes. Dans le cas de *Rhodorus*, les transferts d'énergie caractérisés par les spectres de fluorescence sont moins efficaces, mais ils existent encore. Il faut donc supposer que chez *Porphyridium* des zones de stroma sont encore en contact avec les lamelles pour que les transferts se réalisent.

Les plastides des Rhodophycées diffèrent de ceux des autres végétaux par la consistance de leur stroma. Ils sont susceptibles de changer de forme et de se morceler (BIEBL, 1936). Cette malléabilité semble liée à l'absence de liaisons entre les lamelles. Celles-ci « flottent » dans une masse stromatique abondante et elles peuvent glisser facilement, permettant ainsi des déformations du plaste.

Le stroma est susceptible de gonflement lorsque la pression osmotique du milieu diminue et pour des concentrations inférieures à 20 g/l de NaCl la membrane du plaste éclate, libérant les biliprotéines dans la vacuole et le milieu extérieur.

#### C. — LA STRUCTURE LAMELLAIRE DES PLASTES ET LA DISPOSITION DES PIGMENTS LIPOSOLUBLES

L'étude cytologique des infrastructures des plastides permet de reconnaître trois types principaux, caractéristiques des grands embranchements des Algues. Le premier

se trouve chez les Chlorophytes, le deuxième chez les Chromophytes et le troisième chez les Rhodophytes et les Cyanophytes. Les différences portent sur l'arrangement des lamelles. En général, les Chlorophytes ont plus de lamelles et aussi plus de chlorophylle que les autres Algues. Chez celles-ci par contre, les autres pigments sont plus abondants. Cette abondance ne semble pas pouvoir être mise en rapport avec une variation de structure spéciale, lamellaire ou autre.

Parmi les Chlorophytes, les Codiales sont assez particulières, il serait intéressant de vérifier si le deuxième ordre de Siphonales homoplastidiées, celui des Derbésiales, a des plastes du même type et si les hétéroplastidiées (Caulerpales et Dichotomosiphonales) sont aussi comparables. On sait que parmi les Dasycladales, l'*Acetabularia mediterranea* et le *Batophora oerstedii* ont des plastes de type classique (PUISEUX-DAO 1963).

La genèse des plastes a été peu étudiée chez les Algues. Les observations faites au cours de ce travail n'ont pas permis d'apporter de précision à ce sujet sur la formation des lamelles ou leur régression, selon l'état des algues observées. Des vésicules se trouvent de façon assez constante chez *Batrachospermum* et BOUCK (1962) pense qu'elles pourraient intervenir dans la genèse des saccules (Planche IV).

La structure lamellaire se présente selon les méthodes employées (sur coupe, après fixation classique ou en *coloration négative*), soit sous la forme d'unités membranaires, soit sous une forme granulaire. Les deux éléments de structure ont sensiblement les mêmes dimensions, ils représentent deux aspects possibles des lamelles. Les membranes plastidiales sont toujours appariées et constituent ces saccules aplatis à l'intérieur desquels se trouve enclose une phase distincte du stroma du plaste.

Les unités membranaires des lamelles ont des épaisseurs comparables à celles que divers auteurs ont signalées dans les membranes des mitochondries (SJÖSTRAND, 1962) et les membranes plasmiques en général. Les modes de fixation donnent aussi des résultats différents. Les unités membranaires sont bordées vers l'extérieur par les protéines stromatiques et vers l'intérieur par les protéines des lamelles (fig. 19 a).

Classiquement, une unité membranaire (*unit membrane*) est formée d'une couche bimoléculaire de phospholipides entourée de deux couches de polypeptides. On peut supposer dans le cas des plastes qu'une des couches phospholipidiques de l'unité membranaire qui limite la lamelle est remplacée par des molécules de chlorophylle qui jouent le même rôle que les molécules de phospholipides, la tête hydrophile étant vers l'extérieur, le pôle hydrophobe du phytol étant tourné vers l'intérieur du saccule (fig. 19 a). C'est sur ce type qu'est construit le schéma lamellaire de CALVIN (1958). Dans ce schéma, il y a deux fois plus de molécules de chlorophylle que de molécules phospholipidiques, ce qui correspond à peu près aux proportions trouvées pour les chloroplastes (7,5 % de chlorophylle et 3,5 % de phospholipides par rapport à la masse de substance sèche). Le schéma de l'unité membranaire reconstitué à partir de ces données et de celles de SJÖSTRAND (1962) est représenté dans la

## PLANCHE XVIII

- a. Cellule de *Rhodorus marinus* hypertrophiée par passage dans un milieu hypotonique (8 g/l de NaCl) le stroma *st* est très gonflé, les lamelles *l* sont disposées sans ordre ; pyrénolide *py* ; amidon floridéen *af*. Fixation au permanganate de potassium.  $\times 24\ 000$ .
- b. Cellule de *Rhodorus* contractée par un passage dans un milieu hypertonique (NaCl 4M) ; le plaste entoure entièrement la cellule, les lamelles sont parallèles ; pyrénolide *py* ; amidon floridéen, *af*. Fixation au permanganate de potassium.  $\times 30\ 000$ .

figure 19 a. Ce schéma ne rend pas compte des possibilités que semble avoir la chlorophylle a de présenter différentes variétés physiques.

Les caroténoïdes sont disposés plus ou moins régulièrement dans la couche lipidique. Leur quantité varie d'un végétal à un autre. Chez *Stichochrysis*, on peut trouver environ deux molécules de caroténoïdes pour une de chlorophylle alors que chez les végétaux verts il y a généralement quatre molécules de chlorophylle pour une de caroténoïdes ; entre ces deux extrêmes se place le *Rhodospirillum rubrum* où les lamelles contiennent deux fois plus de chlorophylle que de caroténoïdes.

La structure lamellaire est difficilement compatible avec la structure granulaire observée en coloration négative ou par les méthodes d'ombrage. Il existe une assez grande variation dans les dimensions de ces grains. FREY-WYSSLING (1957) les suppose globulaires et estime leur diamètre à 60 Å chez *Aspidistria*. PARK et FONG (1961) donnent comme dimension des quantasomes de *Spinacia* 200 Å de diamètre à la surface de la lamelle sur 100 Å d'épaisseur. Nous avons vu que les granules visibles dans le *Mais* après coloration négative mesurent environ 120 Å de diamètre et 80 Å d'épaisseur. La figure 19 b donne une interprétation possible de la disposition des molécules de chlorophylle et de phospholipides dans une structure granulaire.

Chaque méthode d'étude peut présenter des causes d'erreur ; il est donc difficile de connaître les dimensions exactes de ces particules. Il semble aussi que leur taille puisse varier avec l'organisme étudié. Ainsi *Rhodospirillum rubrum* aurait des particules globulaires de 85 Å de diamètre. La structure globulaire s'observe sans fixation ou après fixation au formol, alors que la structure lamellaire est mise en évidence par la fixation osmique ou permanganique. Il est difficile de concevoir ces deux types de

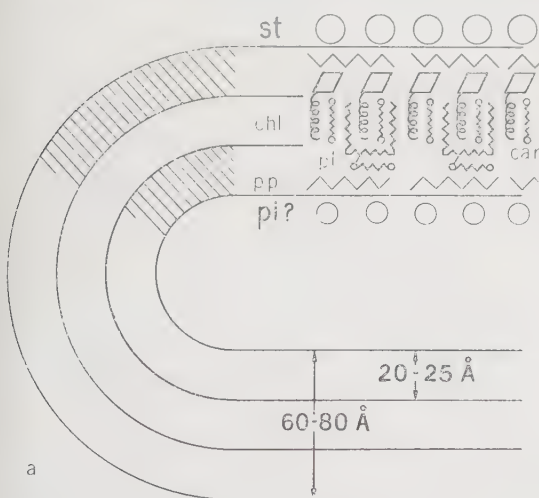


FIG. 19 a. — Schéma d'une lamelle double tentant de localiser les pigments dans l'unité membranaire (d'après CALVIN, 1958 et SJÖSTRAND, 1962)..

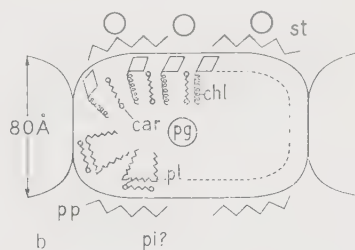


FIG. 19 b. — Schéma tenant compte de la structure granulaire. Les molécules de chlorophylle et de phospholipides sont réparties à la périphérie du granule ; même légende que pour la figure 19 a ; pg, protéine entrant dans le complexe lipoprotéique du granule.

st : protéines globulaires du stroma ; pp, chaîne polypeptidique ; chl : chlorophylle ; car, caroténoïdes ; pl, phospholipides ; pi, protéines de la zone interne du sacculle.

structure comme existant simultanément, on peut soupçonner que les procédés d'étude sont responsables de cette dualité. D'après PARK et PON (1961), le quantasome serait une particule élémentaire recouverte d'une portion de membrane osmophile.

On conçoit mal la constitution de cette membrane morcelable. Les granules seraient des agrégats de protéines globulaires ou des complexes macromoléculaires lipoprotéiques mis en évidence soit par ombrage, soit par l'acide phosphotungstique. On peut supposer que ces granules ne représentent qu'une partie de la structure protéique de la lamelle, les autres protéines n'étant pas mises en évidence par ces méthodes.

On peut remarquer enfin que la chloroplastine isolée par WOLKEN (1961) est une unité lipoprotéique contenant de la chlorophylle et des caroténoïdes. Le diamètre des particules de chloroplastine est de 100 Å, donc de l'ordre de grandeur des grains observés présentement. On peut se demander si ces grains correspondent à une unité physiologique. L'unité photosynthétique pour PARK et PON (1963) aurait un « poids moléculaire » de 960 000 ou du double, ce qui correspondrait à un quantasome ou à deux.

Si l'étude des lamelles reste encore très incomplète, la méthode de *coloration négative* permet une meilleure appréciation des volumes que les méthodes d'ombrage. On peut notamment observer les lamelles sur champ et voir la superposition de plusieurs structures. Leur étude chez *Stichochrysis* pose un problème de structure important. L'épaisseur des lamelles observée sur coupes et en *coloration négative*, est en moyenne deux fois plus petite que celle des lamelles des autres végétaux. Les extrémités des saccules, parfois visibles, permettent de confirmer ce point de vue. Les particules ont 40 Å de diamètre, ce qui est très faible. Les éléments qui constituent les lamelles doivent être rapprochés ou en nombre réduit. Il est difficile de conserver ici le schéma de lamelle de la figure 19 *a* et *b*.

Dans les quantasomes, les dosages indiquent que les molécules de chlorophylle sont au nombre de 115 (PARK et PON, 1963) (le rapport de la surface totale à celle d'une molécule de chlorophylle est de 140). Si les granules qui composent les lamelles du Maïs ont seulement 120 Å de diamètre, on ne doit avoir à la surface qu'une cinquantaine de molécules de chlorophylle. Il est possible dans ce cas de supposer des groupements de ces unités qui correspondraient à l'unité physiologique contenant 300 molécules de chlorophylle.

Pour le plaste du *Stichochrysis*, l'unité photosynthétique peut être plus petite que chez les autres végétaux ; un renseignement à ce sujet pourrait être obtenu par l'étude de la photosynthèse en lumière intermittente.

#### D. — LA RÉACTION DE MOLISCH

Une interprétation de la réaction de MOLISCH est recherchée depuis très longtemps déjà (voir PEKAREK, 1938 et WEBER, 1937). En microscopie photonique, on a remarqué que les granums ne devaient pas réagir au nitrate d'argent, mais le phénomène a été mal interprété. On avait aussi constaté que la réaction est uniquement réalisable *in vivo*, car dans les cellules lésées, les chloroplastes ne réagissent jamais. Les interprétations sont de deux sortes que l'on peut résumer ainsi :

1) La réaction est due à la présence d'acide ascorbique qui donne un précipité avec le nitrate d'argent, comme c'est le cas avec des cellules animales.

2) La réaction est sensibilisée par la lumière et liée au mécanisme de la photosynthèse et à la chlorophylle. C'est ainsi que THOMAS, POST et VERTREGT (1954) ont montré que le spectre d'action de la réaction est voisin du spectre d'absorption de la chlorophylle.

L'observation au microscope électronique apporte quelques faits nouveaux. Chez le Maïs, le précipité d'argent est localisé au niveau des lamelles intergranaires. A cet endroit, la chlorophylle est certainement moins abondante que dans les granums, elle peut même être absente. Par contre dans les granums très actifs du point de vue de la photosynthèse, il ne se dépose pas de précipité. Tout au plus remarque-t-on que leur pourtour peut être le siège d'une réduction plus intense de l'argent. Ces résultats sont assez décevants, car difficiles à interpréter et semblent contraires à une intervention d'un phénomène lié à la photosynthèse.

Chez les algues, par contre, le précipité se trouve au niveau des lamelles, sur toute leur surface, or on sait bien que la chlorophylle a la même localisation. Les mesures montrent que les centres des grains de précipité doivent se trouver dans la zone externe de chaque lamelle (fig. 20).

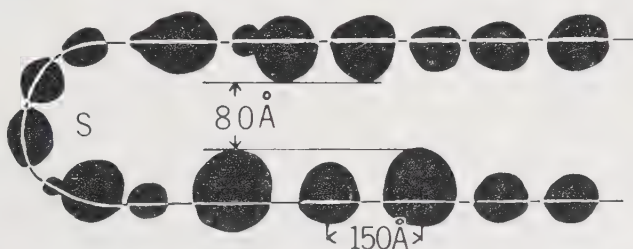


FIG. 20. — Disposition des grains d'argent au niveau des lamelles chez les Rhodophycées. La surface du saccule a été représentée par un trait ; s, zone interne du saccule.

L'interprétation des expériences en présence de 3-(4-chlorophényl)-1,1-dyméthylurée (CMU), est plus délicate. Dans ce cas, la réaction photochimique n'est pas bloquée; un photoproduit réducteur peut éventuellement se former en faible quantité, mais peut-être suffisante pour réduire le nitrate d'argent.

On constate cependant qu'à 3,5 °C, la réaction est positive. Il semble bien qu'à cette température les enzymes n'interviennent que très lentement. Le pouvoir réducteur pourrait donc être d'origine photochimique. Des expériences à plus basse température n'ont pu être réalisées.

Il est à remarquer que la taille des grains d'argent varie assez peu et lorsque le précipité est bien régulier un espacement assez constant sépare les grains d'une même lamelle. Ces faits permettent de conclure que la réduction se produit en des points bien localisés sur la lamelle et que la réduction se répète identiquement sur toute l'étendue lamellaire.

## CONCLUSIONS

Deux algues nouvelles, le *Rhodosorus marinus* GEITLER et le *Stichochrysis* sp. ont été plus particulièrement utilisées comme matériel d'étude dans ce travail. Elles ont essentiellement permis d'aborder des problèmes physiologiques concernant l'équipement pigmentaire, en particulier les propriétés spectroscopiques des pigments et la structure des lamelles.

Les mesures faites avec *Rhodospirillum rubrum* ont montré qu'il est raisonnable de proposer une répartition des biliprotéines dans tout le stroma du plaste et non dans les lamelles.

*Stichochrysis* sp. est aussi intéressant à plusieurs égards. Cette Chrysophycée présente diverses formes de chlorophylle *a*, dans des proportions inhabituelles que l'on a caractérisées à l'aide soit des spectres d'absorption, soit de leur fluorescence.

*Stichochrysis* sp. possède des lamelles beaucoup plus fines que les autres algues. En raison de leur faible épaisseur, ses lamelles présentent un intérêt spécial pour étudier les rapports entre la structure et la physiologie.

Plus généralement, les problèmes d'infrastructure du plaste en microscopie électronique ont été abordés à l'aide de la méthode des coupes et de la *coloration négative*. Les plastides des algues ont une diversité assez faible qui porte sur le nombre de lamelles et leur mode de groupement. Les lamelles ont la même constitution et les mêmes dimensions que celles des végétaux supérieurs, elles sont formées d'unités membranaires comme toutes les membranes plasmiques. Les grains qui composent les lamelles, visibles en *coloration négative* sont discoïdes ou globuleux; leur taille varie autour de 100 Å. L'estimation de la surface lamellaire permet de vérifier les hypothèses sur la répartition des différents éléments constitutifs notamment des pigments liposolubles.

Les Rhodophycées ont permis enfin d'étudier la réduction du  $\text{AgNO}_3$  réalisée *in vivo* et à la lumière. Elle se localise sur les lamelles de façon très ordonnée qui souligne qu'une certaine quantité de pouvoir réducteur apparaît régulièrement à leur surface.

Cette réaction semble, tant au point de vue structural qu'au point de vue spectral, liée au phénomène photosynthétique. La répartition des grains d'argent évoque, sans qu'il soit actuellement possible de le préciser davantage, la disposition régulière d'unités structurales dont les dimensions correspondent aux « unités photosynthétiques ».

## REMERCIEMENTS

Ces recherches ont débuté lorsque Monsieur le Professeur L. PLANTEFOL, Membre de l'Institut, a bien voulu me choisir comme Assistant à la Sorbonne. Il s'est toujours intéressé à mon travail et m'a accordé l'honneur de présider mon Jury. Qu'il trouve ici l'expression de ma très respectueuse reconnaissance.

Monsieur le Professeur A. MOYSE, Directeur du Laboratoire de Photosynthèse du C.N.R.S., m'a accueilli dans son Laboratoire et m'a suggéré le sujet de cette thèse, je le remercie pour l'intérêt qu'il a sans cesse manifesté pour mes recherches, les critiques qu'il y a apportées, les conseils précieux qu'il m'a prodigués.

Je suis profondément reconnaissant à Monsieur le Professeur R. BUVAT, Directeur du Laboratoire de Botanique de l'Ecole Normale Supérieure, qui m'a donné la possibilité d'entreprendre l'étude cytologique de mon matériel dans son service de Microscopie Electronique. Sa haute compétence ainsi que l'attention constante qu'il a accordée à ce travail ont largement contribué à sa réalisation.

J'exprime ma vive gratitude à Monsieur le Professeur J. LAVOREL, Sous-Directeur du Laboratoire de Photosynthèse du C.N.R.S., qui a orienté mes recherches, y apportant ses critiques pertinentes et précieuses.

J'ai une dette toute particulière envers Mademoiselle N. HAUSWIRTH qui a collaboré avec beaucoup de compétence et d'enthousiasme à l'accomplissement de cette thèse.

J'ai tiré un grand profit des discussions que j'ai eues avec Monsieur J.P. THIERY sur les méthodes de *coloration négative*; qu'il trouve ici l'expression de ma reconnaissance.

Je remercie enfin tous ceux qui ont bien voulu m'aider de leurs conseils ou de leurs connaissances techniques.

## BIBLIOGRAPHIE

- AIRTH R.L. et BLINKS L.R., 1956 — A new phycoerythrin from *Porphyra naiadum*. *Biol. Bull.*, **111**, 321-327.
- ALLEN M.B., FRENCH C.S. et BROWN J.S., 1960. — Chlorophylls in algal groups in *Comparative biochemistry of photoreactive systems*. ALLEN M.B. éd., Academic Press, New York et Londres, 32-52.
- BERKALOFF C., 1961. — Etude au microscope électronique des plastes de *Laminaria saccharina* L. *C. R. Acad. Sc.* **252**, 2747-2749.
- BERKALOFF C., 1963. — Les cellules méristématiques d'*Himanthalia lorea* (L.) S.F. GRAY. Etude au microscope électronique. *J. Microscopie*, **2**, 213-228.
- BIEBL R., 1936. — Untersuchungen an Rotalgenplastiden. *Protoplasma*, **26**, 386-412.
- BIEBL R., 1962. — Seaweeds in *Physiology and biochemistry of Algae*. LEWIN R.A. éd., Academic Press, New York et Londres, p. 806.
- BOUCK G.B., 1962. — Chromatophore development, pits and other fine structure in the red alga *Lomentaria baileyana* (Haw) Farlow. *J. cell. Biol.*, **12**, 553-569.
- BRODY S., 1958. — New excited state of chlorophyll. *Science*, **128**, 838-839.
- BRODY S. et BRODY M., 1961. — A quantitative assay for the number of chromatophores on a chromoprotein ; its application to phycoerythrin and phycocyanin. *Biochim. Biophys. Acta*, **50**, 348-352.
- BRODY M. et EMERSON R., 1959. — The effect of wavelength and intensity of light on the proportion of pigments in *Porphyridium cruentum*. *Amer. J. Bot.*, **46**, 433-440.
- BRODY M. et VATTER A.E., 1959. — Observations on cellular structure of *Porphyridium cruentum*. *J. biophys. biochem. Cytol.*, **5**, 289-294.
- BROWN J.S., 1962. — Biochemical studies of chlorophyll *a* 695 and the separation of pheophytin *a* complexes by differential centrifugation. *Carnegie Inst. Wash. Year Book*, **61**, 366-369.
- BROWN J.S., 1963. — Forms of chlorophyll *a* and photosynthesis. *Colloq. Intern. Photosynthèse Centre Natl Rech. Sc.* éd. Paris, n° **119**, sous presse.
- BROWN W.V., MOLLENHAUER H. et JOHNSON C., 1962. — An electron microscope study of silver nitrate reduction in leaf cells. *Amer. J. Bot.*, **49**, 57-63.
- BUVAT R., 1963. — Electron microscopy of plant protoplasm, in *International Review of Cytology*, **14**, Academic press, New York, 41-155.
- BUTLER W.L., 1961. — A far red absorbing form of chlorophyll, *in vivo*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **93**, 413-422.
- CALVIN M., 1958. — From microstructure to macrostructure and function in the photochemical apparatus in *Photochemical Apparatus, Brookhaven Symposia in Biol.*, **11**, 160-180.
- CHAMPIGNY M.L., 1959. — Sur l'influence de l'intensité des différentes radiations lumineuses dans la photosynthèse de *Rhodospirillum rubrum* GEITLER (Rhodophycée). *Rev. Cytol. Biol. végét.*, **21**, 1-40.
- DE KOUCHKOVSKY Y., 1963. — Induction photosynthétique des chloroplastes isolés. *Physiol. Vég.*, **1**, 15-76.
- DRAWERT H. et MIX M., 1961. — Licht und elektronenmikroskopische untersuchungen an Desmidiaceen. V Mitt. Über die Variabilität der Chloroplastenstruktur bei *Micrasterias rotata*. *Planta*, **56**, 648-665.
- DUYSENS L.N.M., 1951. — Transfer of light energy within the pigment systems present in photosynthesizing cells. *Nature*, **168**, 548-549.
- DUYSENS L.N.M., 1963. — Studies on the mechanism of two photosynthetic pigment systems by means of absorption and fluorescence difference spectrophotometry. *Colloq. Intern. Photosynthèse Centre Natl Rech. Sc.* éd., Paris, n° **119**, sous presse.
- EMERSON R. et ARNOLD W., 1932. — The photochemical reaction in photosynthesis. *J. gen. Physiol.*, **16**, 191-205.
- EMERSON R., CHALMERS R. et CEDERSTRAND C., 1957. — Some factors influencing the long wave limit of photosynthesis. *Science*, **123**, 673.

- FELDMANN J. et SCHOTTER G., 1949. – Sur la structure du pyrenoïde chez les Rhodophycées. *C. R. Acad. Sc.*, **228**, 196-198.
- FREI Y.F., 1962. – The derivative absorption spectra of chlorophyll in algae and leaves at low temperatures. *Biochim. Biophys. Acta*, **57**, 82-87.
- FRENCH C.S. et ELLIOTT R.F., 1958. – The absorption spectra of chlorophylls in various algae. *Carnegie Inst. Wash. Year Book*, **57**, 278-286.
- FRENCH C.S. et FORK D.C., 1963. – Two primary photochemical reactions in photosynthesis driven by different pigments. *Vth Intern. Congr. Biochem.* Moscow, 10-16 August 1961, vol. VI, Pergamon Press, Oxford, 121-136.
- FREY-WYSSLING A., 1957. – Macromolecules in cell structure. Harward Univerty Press, Cambridge, Massachusetts.
- FREY-WYSSLING A. et STEINMANN E., 1953. – Ergebnisse der Feinbau-Analyse der Chloroplasten. *VJSchr. Gesellsch. Naturforsch. Zürich*, **98**, p. 20.
- GARNIER J., 1962. – Action de la température sur le renouvellement des différents pigments d'*Oscillatoria subbrevis* Schmidle (Cyanophycée), à la lumière. *C.R. Acad. Sc.*, **254**, 2221-2223.
- GIBBS S.P., 1960. – The fine structure of *Euglena gracilis* with special reference to the chloroplasts and pyrenoides. *J. Ultrastruct. Res.*, **4**, 127-148.
- GIRAUD G., 1958. – Sur la vitesse de croissance d'une Rhodophycée monocellulaire marine, le *Rhodorus marinus* GEITLER, cultivée en milieu synthétique. *C.R. Acad. Sc.*, **246**, 3501-3504.
- GIRAUD G., 1959. – Sur les rapports entre le spectre d'absorption et l'intensité photosynthétique de *Rhodorus marinus* GEITLER (Rhodophycée). *C.R. Acad. Sc.*, **248**, 277-280.
- GIRAUD G., 1960. – Les spectres de fluorescence des algues à bilichromoprotéines. *Colloq. Intern. Centre Natl Rech. Sc. Paris*, n° **103**, 83-90.
- GIRAUD G., 1961. – La fluorescence de quelques Algues marines étudiées *in vivo*. in *IV<sup>e</sup> Congr. intern. des Algues marines* (sous presse).
- GIRAUD G., 1962. – Les infrastructures de quelques algues et leur physiologie. *J. Microscopie*, **1**, 251-274.
- GIRAUD G., 1963. – Etude de la structure des lamelles des chloroplastes par application de la technique de coloration négative. *Colloq. ann. Soc. Fr. Micr. électronique, J. Microscopie*, **2**, 30-31.
- GIRAUD G., 1963. – La réaction de MOLISCH étudiée à l'aide du microscope électronique. *Colloq. ann. Soc. Fr. Micr. électronique, J. Microscopie*, **2**, 31.
- GOODWIN T.W., 1955. – Carotenoids in *Modern Methoden der Pflanzenanalyse*, vol. III, PAECH K. et TRACEY M.V., Springer Berlin, p. 297.
- HATTORI A. et FUJITA Y., 1959. – Spectroscopic studies on the phycobilin pigments obtained from blue-green and red algae. *J. Biochem.*, **46**, 903-909.
- KOK B., 1959. – Light induced absorption changes in photosynthetic organisms. II A splitbeam difference spectrophotometer. *Plant Physiol.*, **34**, 184-192.
- KOK B. et HOCH G., 1963. – The photoreactions of photosynthesis. *Colloq. Intern. Photosynthèse Centre Natl Rech. Sc. éd.*, Paris, n° **119** (sous presse).
- LAVOREL J., 1957. – Influence of concentration on the absorption spectrum and the action spectrum of fluorescence of dye solutions. *J. phys. Chem.*, **61**, 1600-1605.
- LAVOREL J., 1962. – Hétérogénéité de la chlorophylle *in vivo*. I Spectres de fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta*, **60**, 510-523.
- LEFORT M., 1960. – Nouvelles recherches sur l'infrastructure du chromatoplasma des Cyanophycées. *C.R. Acad. Sc.*, **251**, 3046-3048.
- LUFT J.H., 1961. – Improvements in epoxy resin embeddind methods. *J. biophys. biochim. Cytol.* **9**, p. 409.
- MAC KINNEY G., 1941. – Absorption of light by chlorophyll solutions. *J. biol. Chem.*, **140**, 315-322.
- MENKE W., 1962. – Structure and chemistry of plastids. in *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **13**, 27-44.
- MICHARD H., 1960. – Etude de la croissance et de la pigmentation d'une Chrysophycée marine. Diplôme d'Etudes Supérieures, Paris.
- MOYSE A., COUDERC D. et GARNIER J., 1957. – L'influence de la température sur la croissance et la photosynthèse d'*Oscillatoria subbrevis* (Cyanophycée). *Rev. Cytol. Biol. vég.*, **28**, 293-307.
- MOYSE A. et GUYON D., 1963. – Effet de la température sur l'efficacité de la phycocyanine et de la chlorophylle chez *Aphanocapsa* (Cyanophycée) in *Studies on microalgae and photosynthetic bacteria*. Japanese Society of Plants Physiologists, The University of Tokyo Press, 253-270.

- MYERS J., PHILLIPS J.N. et GRAHAM J.R., 1951. — On the mass culture of algae. *Plant Physiol.*, **26**, 539-548.
- MYERS J. et KRATZ W.A., 1955. — Relations between pigment content and photosynthetic characteristics in blue-green alga. *J. gen. Physiol.*, **39**, 11-22.
- NIKLOWITZ W. et DREWS G., 1956. — Beiträge zur Cytologie der Blaualgen I. Untersuchungen zur Substruktur von *Phormidium uncinatum*. *Arch. Mikrobiol.*, **24**, 134-146.
- O'hEOCHA C., 1958. — Comparative biochemical studies of the phycobilins. *Arch. Biochem. Biophys.*, **73**, 207-219.
- O'hEOCHA C., 1962. — Phycobilins. in *Physiology and Biochemistry of Algae*, LEWIN R.A. éd. Academic Press New York et Londres, 421-435.
- PARK R.B. et PON N.G., 1961. — Correlation of structure with function in *Spinacea oleracea* chloroplasts. *J. mol. Biol.*, **3**, 1-10.
- PARK R.B. et PON N.G., 1963. — Chemical composition and the substructure of lamellae isolated from *Spinacia oleracea* chloroplasts. *J. mol. Biol.*, **6**, 105-114.
- PEKAREK J., 1938. — Die Lokalisation des Silbernitrat-Reduktors in den Chloroplasten. *Protoplasma*, **30**, 534-546.
- PRINGSHEIM E.G., 1955. — Kleine mitteilungen über Flagellaten und Algen. I. Algenartige Chrysophyceen in Reinkultur. *Arch. Mikrobiol.*, **21**, 75-79.
- PUITSEUX-DAO S., 1963. — Les Acétabulaires, matériel de laboratoire, les résultats obtenus avec ces Chlorophycées. *Ann. Biol.*, **11**, 99-154.
- ROBERTSON J.D., 1959. — The ultrastructure of cell membranes and their derivatives. *Biochem. Soc. Symp.*, **16**, 3-43.
- SAGER R. et PALADE G.E., 1956. — Structure and development of the chloroplast in *Chlamydomonas*. *J. biophys. biochem. Cytol.*, **3**, 463-487.
- SHIBATA K., 1958. — Spectrophotometry of intact biological materials. *J. Biochem.*, **45**, 599-601.
- SJÖSTRAND F.S., 1962. — Critical evaluation of ultrastructural patterns with respect to fixation in *The interpretation of ultrastructure*, HARRIS R.J. éd., Academic Press, New York et Londres, 47-67.
- STRAIN H.H., 1958. — Chloroplast pigments and chromatographic analysis. 32<sup>nd</sup> Annual Priestly lectures, Penn. State Univ., University Park éd., Pennsylvania, 1-62.
- SWINGLE S.M. et TISELIUS A., 1951. — Tricalcium phosphate as an absorbant in the chromatography of proteins. *Biochem. J.*, **48**, 171-174.
- THIERY J.P., 1961. — Application de la technique de *coloration négative* à l'étude de quelques structures biologiques. *C. R. Soc. Biol.*, **155**, 1804-1821.
- THIERY J.P., 1962. — Etude des réactions cytochimiques du fer au microscope électronique. *J. Microscopie*, **1**, 127-136.
- THOMAS J.B., MINNAERT K. et ELBERS P.F., 1956. — Chlorophyll concentrations in plastids of different groups of plants. *Acta bot. neerl.*, **5**, 315-321.
- THOMAS J.B., POST L.C. et VERTREGT N., 1954. — Localization of chlorophyll within the chloroplast. *Biochim. Biophys. Acta*, **13**, 20-30.
- VALENTINE R.C. et HORNE R.W., 1962. — An assesement of negative staining techniques for revealing ultrastructure, in *The interpretation of ultrastructure*, HARRIS R.J. éd., Academic Press, New York et Londres, p. 269.
- WEBER F., 1937. — Silber - Reduktion der Chloroplasten. *Protoplasma*, **29**, 427-434.
- WEIER T.E. et THOMSON W.W., 1962. — The grana of starch-free chloroplasts of *Nicotiana rustica*. *J. cell. Biol.*, **13**, 89-108.
- WEIER T.E., STOCKING C.R., THOMSON W.W. et DREVER H., 1963. — The grana as structural units in chloroplasts of mesophyll of *Nicotiana rustica* and *Phaseolus vulgaris*. *J. Ultrastruct. Res.*, **8**, 122-143.
- WITT H.T., MÜLLER A. et RUMBERG B., 1963. — Electron transport system in photosynthesis of green plants analysed by sensitive flash photometry. *Nature*, **197**, 987-991.
- WOLKEN J.J., 1961. — The chloroplast : its lamellar structure and molecular organization in *Macromolecular complexes*, EDDIS M.V. éd., Ronald Press Co N.Y.
- WOLKEN J.J. et SCHWERTZ F.A., 1953. — Chlorophyll monolayers in chloroplasts. *J. gen. Physiol.*, **37**, 111-118.

# Table des Matières

|                                                                                                                                          | page |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| RÉSUMÉ .....                                                                                                                             | 203  |
| SUMMARY .....                                                                                                                            | 203  |
| INTRODUCTION .....                                                                                                                       | 204  |
| MATÉRIEL ET MÉTHODES .....                                                                                                               | 207  |
| A. — Matériel et conditions de culture .....                                                                                             | 207  |
| B. — Méthodes d'étude des pigments .....                                                                                                 | 209  |
| 1) Extraction et dosage des pigments .....                                                                                               | 209  |
| 2) Etude de la fluorescence et de la photosynthèse .....                                                                                 | 210  |
| C. — Méthodes d'étude cytologique .....                                                                                                  | 210  |
| 1) Méthodes d'étude en microscopie électronique .....                                                                                    | 211  |
| 2) Précision des mesures obtenues à partir des photographies de microscopie élec-<br>tronique .....                                      | 211  |
| ETUDE DES PIGMENTS PHOTOSYNTHÉTIQUES DE <i>Rhodorus marinus</i> ET DE <i>Stichochrysis</i> sp. . .                                       | 212  |
| A. — Etude des pigments .....                                                                                                            | 212  |
| 1) Les pigments de <i>Rhodorus marinus</i> .....                                                                                         | 212  |
| 2) Les pigments de <i>Stichochrysis</i> sp. ....                                                                                         | 215  |
| B. — La fluorescence des pigments de <i>Rhodorus marinus</i> et de <i>Stichochrysis</i> sp. ....                                         | 218  |
| 1) Etude de la fluorescence à 717 et 720 m $\mu$ .....                                                                                   | 219  |
| 2) Modifications de la fluorescence aux basses températures .....                                                                        | 221  |
| 3) Spectres en écoulement intermittent .....                                                                                             | 222  |
| C. — Les modifications des spectres de fluorescence des Rhodophycées .....                                                               | 224  |
| ETUDE DES INFRASTRUCTURES DE L'APPAREIL PHOTOSYNTHÉTIQUE DES ALGUES .....                                                                | 226  |
| A. — Etude des coupes de plastas en microscopie électronique .....                                                                       | 226  |
| 1) <i>Vaucheria</i> (Xanthophycée) .....                                                                                                 | 226  |
| 2) <i>Stichochrysis</i> sp. (Chrysophycée) .....                                                                                         | 227  |
| 3) Rhodophycées .....                                                                                                                    | 228  |
| 4) <i>Codium tomentosum</i> et <i>Bryopsis plumosa</i> (Chlorophycées) .....                                                             | 231  |
| 5) Comparaison avec les chloroplastes de Maïs .....                                                                                      | 232  |
| B. — Etude structurale par la coloration négative .....                                                                                  | 232  |
| 1) Essai de la coloration négative sur les chloroplastes de Maïs .....                                                                   | 233  |
| 2) <i>Stichochrysis</i> sp. ....                                                                                                         | 234  |
| 3) Rhodophycées .....                                                                                                                    | 234  |
| 4) <i>Codium tomentosum</i> .....                                                                                                        | 234  |
| 5) Comparaison des mesures obtenues d'après les coupes et par la coloration négative .....                                               | 235  |
| APPORT DE LA MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE A LA CONNAISSANCE DE LA LOCALISATION DES PIGMENTS<br>PHOTOSYNTHÉTIQUES .....                       | 235  |
| A. — Calcul de la surface lamellaire .....                                                                                               | 236  |
| B. — Mesure des molécules de biliprotéines .....                                                                                         | 237  |
| C. — Etude des modifications cytologiques provoquées chez <i>Rhodorus marinus</i> par les<br>variations de concentration du milieu ..... | 238  |
| D. — Etude de la réaction de MOLISCH au microscope électronique .....                                                                    | 239  |
| 1) La réaction de MOLISCH précisée sur les chloroplastes de Maïs .....                                                                   | 239  |
| 2) La réaction de MOLISCH chez les Algues .....                                                                                          | 241  |
| DISCUSSION .....                                                                                                                         | 243  |
| A. — Les pigments de <i>Rhodorus marinus</i> et de <i>Stichochrysis</i> .....                                                            | 243  |
| 1) <i>Rhodorus</i> .....                                                                                                                 | 243  |
| 2) <i>Stichochrysis</i> .....                                                                                                            | 243  |
| B. — La localisation des biliprotéines dans les plastas de <i>Rhodorus</i> .....                                                         | 246  |
| C. — La structure lamellaire des plastas et la disposition des pigments liposolubles ....                                                | 247  |
| D. — La réaction de MOLISCH .....                                                                                                        | 250  |
| CONCLUSIONS .....                                                                                                                        | 251  |
| BIBLIOGRAPHIE .....                                                                                                                      | 253  |

## DEUXIÈME THÈSE

---

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

**Localisation infrastructurale des enzymes**

---

Vu et approuvé :

Paris, le **5** novembre 1963

*Le Doyen de la Faculté des Sciences*

Marc ZAMANSKY

Vu et permis d'imprimer :

*Le Recteur de l'Académie de Paris*

Jean ROCHE

IMPRIMÉ EN FRANCE  
IMP. MARCEL BON - VESOUL  
DÉPOT LÉGAL: IMP. 997-IV-63  
—— ÉDITEUR 1173 ——



